

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 4 月 29 日 (29.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/035829 A1

(51) 国際特許分類: C12Q 1/68
(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013176
(22) 国際出願日: 2003 年 10 月 15 日 (15.10.2003)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ:
特願 2002-299931
2002 年 10 月 15 日 (15.10.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三井化学株式会社 (MITSUI CHEMICALS, INC.) [JP/JP];
〒105-7117 東京都港区東新橋一丁目 5 番 2 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 齋藤 烈 (SAITO, Isao) [JP/JP]; 〒607-8242 京都府京都市山科区勤修時柴山 1-2 1 Kyoto (JP). 岡本 晃充 (OKAMOTO, Akimitsu) [JP/JP]; 〒615-8077 京都府京都市西京区桂芝ノ下町 1 5-1-4 0 3 Kyoto (JP). 金谷 啓一郎 (KANATANI, Kelichiro) [JP/JP]; 〒615-8184

京都府京都市西京区榎原水築町 1 4-5 0 5 Kyoto (JP). 吉田 存方 (YOSHIDA, Nobumasa) [JP/JP]; 〒297-0017 千葉県茂原市東郷 1144 三井化学株式会社内 Chiba (JP). 木島 重基 (KIJIMA, Shigemoto) [JP/JP]; 〒105-7117 東京都港区東新橋一丁目 5 番 2 号 三井化学株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 宮崎 昭夫, 外 (MIYAZAKI, Teruo et al.); 〒107-0052 東京都港区赤坂 1 丁目 9 番 2 0 号 第 1 6 興和ビル 8 階 Tokyo (JP).

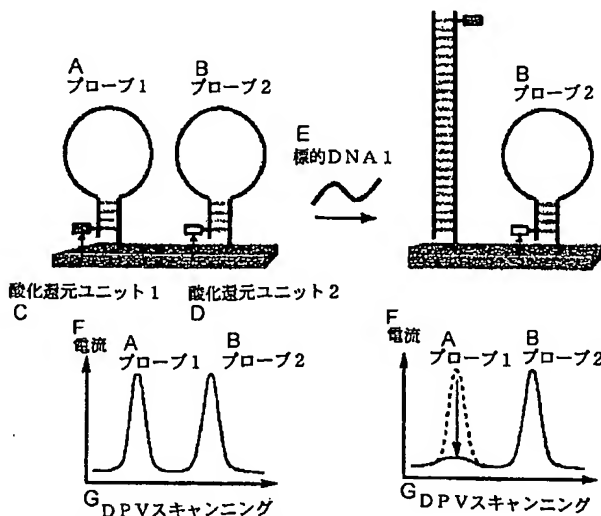
(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,

[続葉有]

(54) Title: PROBES FOR DETECTING GENE AND METHOD OF ELECTROCHEMICALLY DETECTING GENE

(54) 発明の名称: 遺伝子検出用プローブと電気化学的遺伝子検出方法



A...PROBE 1 E...TARGET DNA 1
B...PROBE 2 F...CURRENT
C...REDOX UNIT 1 G...DPV SCANNING
D...REDOX UNIT 2

(57) Abstract: Probes for detecting a gene, each containing a terminal redox unit and being capable of having a hairpin structure, are fixed on an electrode and used as a DNA chip. Thus, a target gene is conveniently detected at a high S/N ratio without labeling a sample. There has been developed a system whereby conversion of a hairpin structure into a double-strand structure accompanying the recognition of a target gene is detected based on a change in an electrochemical system.

[続葉有]



GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(57) 要約:

末端に酸化還元性ユニットを含み、ヘアピン構造をとりうる遺伝子
検出用プローブを電極上に固定し DNA チップとして利用すること
で、試料を標識することなく、簡便かつ高 S / N 比で標的遺伝子の検
出を行う。標的遺伝子の認識に伴うヘアピン構造から二本鎖構造への
変化を、電気化学的な系の変化を利用して検出する系を開発した。

明 細 書

遺伝子検出用プローブと電気化学的遺伝子検出方法

技術分野

本発明は、電気化学的な核酸の検出を可能にするヘアピン型プローブ、及びこれを固定した標的遺伝子検出用チップ、並びにこれらを用いた電気化学的な核酸の検出法に関する。

背景技術

ハイブリダイゼーションに基づく遺伝子の解析法として、様々な方法が用いられている。サザンハイブリダイゼーションやノーザンハイブリダイゼーションでは、ゲル電気泳動により分離したDNAやRNAをナイロン膜等に転写し、標識したプローブとのハイブリダイゼーションを行う。DNAチップまたはDNAマイクロアレイ法は、ガラス等の基板に配列の分かっている一群のDNAを高密度に整列化させた状態で固定し、これらをプローブとして、検査対象となるDNAやRNAに対してハイブリダイゼーションを行うことで、ハイスループットな遺伝子解析を可能とする。これらのハイブリダイゼーションによる解析では、プローブまたは検査対象となる核酸のいずれかを放射性化合物または蛍光物質で標識することが一般的である。放射性化合物による標識の場合は、管理区域内での操作が前提であり、利用可能な施設に限られる。一方、蛍光物質による標識では、一般の実験室で操作が可能である反面、検出にレーザー光を用いるため、検出機器が大型化しコストがかかるといった問題点がある。

DNAチップまたはDNAマイクロアレイにおいて、蛍光測定に代わる検出手段として、電気化学的検出法が用いられるようになっている。例えば特許2573443号明細書に開示された方法は、核酸プローブを電極表面に固定化して用いることと、二本鎖核酸に特異的に結合し、かつ電気化学的に

活性な二本鎖認識体（挿入剤）を反応系に添加することを特徴とし、核酸プローブと目的遺伝子からなる二本鎖核酸に結合した挿入剤に由来する酸化還元電流を測定するものである。この方法においては検査対象の核酸分子をあらかじめ標識する必要はないが、ハイブリダイゼーションに続いて、測定系への挿入剤の添加、ならびに過剰な挿入剤の除去といった操作が必要となる。また、このような方法では、測定系において、核酸分子に対する挿入剤の結合量を厳密に制御できない。さらに、一つの電極上でプローブごとに異なった挿入剤を用いるなどの測定系の高度な制御は難しいと考えられる。

発明の開示

本発明は電極に固定した遺伝子検出用プローブに対して、検査対象の核酸を加える他に特別な手続き（検査対象核酸の標識、挿入剤等の添加、酵素の添加など）を必要としない簡便でかつS/N比のよい手法を提供することを課題とする。本発明はまた、単一電極上に複数種の遺伝子検出用プローブを固定し、これらの標的遺伝子の同時検出が可能な手法を提供することも同時に課題とする。

上記課題を解決するために、本発明では、標的遺伝子の認識に伴うヘアピン構造（閉じた構造）から二本鎖構造（開いた構造）への変化を積極的に利用した。すなわち、分子内に互いに相補的な逆向き繰り返し配列とこれらに挟まれた標的遺伝子の認識配列を含むDNA分子を利用した。該DNA分子は、標的遺伝子が存在しない状況では、相補的な逆向き繰り返し配列により安定な分子内二本鎖を形成し、分子全体としてヘアピン状の閉じた構造をとる。標的遺伝子が存在すると、ヘアピン構造におけるループに位置する認識配列により該標的遺伝子を認識し、互いに二本鎖を形成し、開いた構造となる。この過程において、該DNA分子の高次構造は、ヘアピン状態の単独分子から標的遺伝子との二本鎖（ヘアピンの崩壊）へと大きく変化する。

さらに、該DNA分子の一方の末端に酸化還元性ユニットを結合させて、上記のヘアピンの崩壊状態を電気化学的な反応を利用して検出する系を開発した。例えば、上記のヘアピン構造をとる一本鎖核酸からなるプローブの

一方の端部に酸化還元性ユニットを結合させ、他方の端部を電極に固定し、これを標的遺伝子とハイブリダイゼーションさせるとヘアピン構造が崩壊して、該電極上での電気化学的な系が変化する。この変化は、電極に固定されたプローブは、標的遺伝子が存在しない状況では、ヘアピン構造をとるため、末端に結合された酸化還元性ユニットが電極表面に近接しているが、標的遺伝子を認識して二本鎖を形成すると、ヘアピン構造が開いて該酸化還元性ユニットが電極表面から遠ざかることによって生じるものと考えられる。この変化を電流等の電気信号の変化として測定し、標的遺伝子の存在を確認できる。

このように、標的遺伝子の認識に際して構造的に最も大きく変化するプローブの末端に酸化還元性ユニットを結合させることで、酸化還元性ユニット－電極間の距離を変化させることにより、酸化還元性ユニットに由来する電気応答を変化させる手法を開発し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) 標的遺伝子を認識し得る認識配列を含み、かつ核酸及び核酸類似物の少なくとも一方からなる直鎖状分子と、酸化還元性ユニットと、を有する標的遺伝子検出用のプローブであって、

単独では、二本鎖システムと一本鎖ループとからなり、該一本鎖ループが該二本鎖システムにより閉じられたヘアピン構造を形成し、標的遺伝子の存在を示す被検出配列と前記認識配列とが二本鎖を形成することにより、該ヘアピン構造が開かれて、該プローブの一部に被検出配列との2本鎖部分が形成されるために必要な配列を有し、かつ

前記酸化還元性ユニットは、前記ヘアピン構造が形成された場合に前記一本鎖ループ以外で結合または近接する二本の鎖の一方に結合していることを特徴とする標的遺伝子検出用のプローブ。

(2) 前記ヘアピン構造を形成し得る配列が、互いに相補的な2つの逆向き繰り返し配列と、これらの繰り返し配列の間に設けられた被検出配列に相補的な配列からなる標的遺伝子認識配列と、を有する上記(1)項に記載の標的遺伝子検出用のプローブ。

(3) 前記一本鎖分子の少なくとも一部がDNAまたはRNAである上記(1)項または(2)項に記載の標的遺伝子検出用のプローブ。

(4) 前記一本鎖分子の少なくとも一部がペプチド核酸であることを特徴とする上記(1)または(2)項に記載の遺伝子検出用のプローブ。

(5) 前記酸化還元性ユニットが、次のa)及びb)のいずれかの位置に含まれる上記(1)項～(4)項のいずれかに記載の遺伝子検出用のプローブ。

a) 前記二本鎖システムを構成する2つの鎖のいずれか一方の鎖。

b) 前記直鎖状の分子の一方の末端。

(6) 酸化還元性ユニットが、キノン化合物、メタロセン化合物、フラビン化合物及びポルフィリン化合物、金属または金属化合物である上記(1)～(6)項のいずれかに記載の遺伝子検出用のプローブ。

(7) 電極表面を有する担体と、該電極表面に結合した上記(1)項～(6)項のいずれかに記載の標的遺伝子検出用のプローブとを有する標的遺伝子検出用のチップであって、

前記ヘアピン構造が形成された場合に、前記一本鎖ループ以外で結合または近接する二本の鎖のうちの前記還元性ユニットが結合していない方の鎖の末端領域が前記電極と結合していることを特徴とする標的遺伝子検出用のチップ。

(8) 異なる複数の標的遺伝子のそれぞれを特定し得る異なる複数のプローブが、各プローブごとに前記電極表面に固定され、かつ、前記複数の標的遺伝子ごとに電気的応答の異なる酸化還元性ユニットが各プローブに結合している上記(7)項に記載の標的遺伝子検出用のチップ。

(9) 標的遺伝子をプローブを用いて検出する方法において、

上記(7)項に記載の標的遺伝子検出用のチップの電極表面に、該電極表面に固定された該プローブが前記ヘアピン構造をし得る反応系を形成する工程と、

該反応系中で、試料と前記プローブとを、該試料中に被検出配列が含まれている場合に、該プローブと該被検出配列とのハイブリダイゼーションによ

り二本鎖を形成させて、該プローブのヘアピン構造が開かれて一本鎖に変換し得る条件下で反応させる工程と、

該反応を経たチップの電極に電位を与え、得られた電流値に基づいて該プローブと該被検出配列とのハイブリダイゼーションの状態を判定する工程と

を有することを特徴とする標的遺伝子の検出方法。

(10) 異なる複数の標的遺伝子を認識する複数のプローブを、それぞれのプローブごとに異なる電極に固定したプローブを用いる上記(9)項に記載の標的遺伝子の検出方法。

(11) 標的遺伝子をプローブを用いて検出する方法において、

上記(8)項に記載の標的遺伝子検出用のチップの電極表面に、該電極表面に固定された該プローブが前記ヘアピン構造をし得る反応系を形成する工程と、

該反応系中で、試料と前記プローブとを、該試料中に異なる複数の標的遺伝子に対応する被検出配列の少なくとも1種が含まれている場合に、該プローブと該被検出配列とのハイブリダイゼーションによる二本鎖を形成させて、該プローブのヘアピン構造が開かれて二本鎖部分を持たない一本鎖に変換し得る条件下で反応させる工程と、

該反応を経たチップの電極に電位を与え、得られた電流値に基づいて該プローブと該被検出配列とのハイブリダイゼーションの状態を判定する工程と

を有することを特徴とする複数標的遺伝子の同時検出方法。

なお、上記のハイブリダイゼーションの状態とは、通常は、二本鎖を形成しヘアピン構造が崩れたか、ヘアピン構造のままかということを表す。

本発明の遺伝子検出用プローブ及び電気化学的遺伝子検出法を用いることにより、試料となる核酸を調製すること以外に特別な操作をすることなく、目的とする遺伝子を簡便かつ迅速に検出することが可能となる。また、本発明では、標的遺伝子の存否によって、遺伝子検出用プローブ自身の高次構造が変化するため、検出のS/N比が大きく、信頼性の高い検出結果を与える

ことができる。したがって、微量な遺伝子の検出や、SNPの検出等に有効である。

また、標的遺伝子が異なるプローブのそれぞれについて、電気的応答性が異なる酸化還元性ユニットを用いることにより、これらのプローブを単一電極に固定したDNAチップを構成することが可能である。該DNAチップを用いれば、複数の遺伝子についての同時検出が、簡便かつ低コストで行えるようになる。

本発明の手法は、ヘアピン構造を取りうるDNA分子の末端を酸化還元性ユニットで修飾する以外は、特別な処置を必要とせず、極めて簡便である。プローブと標的遺伝子とのハイブリダイゼーションの条件を設定することにより、標的遺伝子のわずかな配列差異等を高感度に検出することが可能となる。

また、酸化還元性ユニットを配列の種類によって付け替えることができるので、異なる酸化還元電位を有するユニットを連結した種々の配列からなるプローブをひとつの電極上に固定化することによって、複数の標的遺伝子を簡便に検出することができる。

図面の簡単な説明

図1は、本発明における代表的な遺伝子検出用プローブの模式図である。

図2は、本発明における代表的な遺伝子検出のフローを示す図である。

図3は、本発明の遺伝子検出プローブを用いた単一電極・多元検出型のDNAチップの模式図である。プローブ1は酸化還元ユニット1を有し、プローブ2は酸化還元ユニット2を有する。

図4は、アントラキノン修飾型ウリジンヌクレオチドの合成フロー図である。

図5は、ODN2(WT)を検体とした場合のディファレンシャルパルスボルタモグラム(ODN1の標的遺伝子の認識配列に完全にマッチする配列を有する場合)を示す。

図6は、ODN3(G178MU)を検体とした場合のディファレンシャ

ルパルスボルタモグラム（ODN 1 の標的遺伝子の認識配列とマッチしない配列からなる場合）を示す。

図 7 は、ODN 4（F 5 0 8）を検体とした場合のディファレンシャルパルスボルタモグラム（ODN 1 の標的遺伝子の認識配列とマッチしない配列からなる場合）を示す。

図 8 は、WT、G 1 7 8 MU、F 5 0 8 の 3 検体について、ディファレンシャルパルスボルタムグラフィーにおける電流量を相対化したグラフである。

図 9 は、WT、G 1 7 8 MU、F 5 0 8 の 3 検体について、ディファレンシャルパルスボルタムグラフィーにおけるピーク電流値を相対化したグラフである。

図 1 0 は、ODN 5 の製造工程を示す図であり、DMSO はジメチルスルホキシドを、DTT はジチオスレイトールを示す。

図 1 1 は、プローブ ODN 5 を用い、ODN 2（WT）を検体とした場合の DPV 結果を示す。

図 1 2 は、プローブ ODN 5 を用い、ODN 3（G178MU）を検体として用いた場合の DPV 結果を示す。

図 1 3 は、プローブ ODN 5 を用い、ODN 4（F508）を検体とした場合の DPV 結果を示す。

図 1 4 は、S/N 比の算定結果を示す。

図 1 5 は、実施例 4 における 1 0 サイクル繰り返した場合の電流値の結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明における「標的遺伝子検出用プローブ」とは、ハイブリダイゼーション反応に基づいて、検出対象としての標的遺伝子を特定するための配列を有する核酸分子の試料中での存在を検出するための分子をいう。本発明における遺伝子検出用プローブは、酸化還元性ユニットを含む、直鎖状の分子か

らなり、単独では二本鎖システムと一本鎖ループからなる閉じたヘアピン構造を取るが、標的遺伝子が存在する条件では該標的遺伝子と二本鎖を形成することにより開いた構造となるような配列的特徴を有しているものである。このようなヘアピン構造を形成し得る構造としては、例えば、分子内に、互いに相補的な逆向き繰り返し配列、ならびに該繰り返し配列の間に標的遺伝子を認識し得る配列をそれぞれ含むものを挙げることができる。

「直鎖状の分子」には、オリゴヌクレオチド等の核酸（DNAまたはRNA）や、化学的に修飾されたヌクレオチド単位からなる核酸類似物（修飾された核酸）や、DNAとRNAを含むいわゆるキメリックヌクレオチド、ペプチド核酸（PNA）の他、ハイブリダイゼーション反応において核酸分子と同様の挙動をし得る他の人工的な直鎖状の分子が含まれる。直鎖状の核酸は例えばDNA合成機等で合成する事が出来、必要により合成されたものをPCRにより増幅してもよい。直鎖状の核酸に類似した分子もそれ自体公知の方法で調製可能である。

「二本鎖システム」とは、分子内に形成された二本鎖をいい、「一本鎖ループ」とは、二本鎖システムの形成に伴い、ループ状となった一本鎖の部分进行う。「閉じた構造」とは二本鎖システムと一本鎖ループからなるヘアピン状の構造をいい、「開いた構造」とは二本鎖システムが解離した状態をいう。なお、「一本鎖ループ」は必ずしもループ状である必要はなく、ランダムな構造を取り得るが、「閉じた構造」の安定化には寄与しない。

「相補的な逆向き繰り返し配列」とは、ワトソン-クリックの塩基対形成により、分子内で安定した二本鎖を形成しうるものであって、かつ標的遺伝子に対して関連のない任意の配列の組であることが好ましく、その繰り返し単位は3塩基以上であることが好ましく、より好ましい長さは5～8塩基であるが、一部の適用においてはさらに長い繰り返し単位が適している。また、該繰り返し単位は、遺伝子検出用プローブ分子の両方の末端、ないしは末端近傍に夫々配置されることが好ましい。

「標的遺伝子を認識し得る認識配列」または標的遺伝子の認識配列とは、検出したい遺伝子を特定する被検出配列（塩基配列）と相補的な配列をいい、

好ましい長さの範囲は7～40塩基である。本発明の遺伝子検出用プローブでは、標的遺伝子の認識配列は、相補的な逆向き繰り返し配列の各繰り返し単位の間挟まれて配置される。このような配列の特徴から、本発明の遺伝子検出用プローブは、標的遺伝子が存在しないか、あるいは標的遺伝子との間でのハイブリダイゼーションの条件が十分でない場合は、相補的な逆向き繰り返し配列同士がハイブリダイズすることにより形成される二本鎖システム構造と、標的遺伝子の認識配列からなる一本鎖ループ構造より構成される閉じた分子構造を形成する。

従って、「分子内に、互いに相補的な逆向き繰り返し配列、ならびに該繰り返し配列の間に標的遺伝子を認識し得る配列をそれぞれ含む」ことは、「単独では二本鎖システムと一本鎖ループからなる閉じた構造を取るが、標的遺伝子が存在する条件では該標的遺伝子と二本鎖を形成することにより開いた構造となるような配列的特徴」の典型的な例といえることができる。

標的遺伝子を認識し得る配列は、一本鎖ループ構造に位置させることが好ましく、上記の繰り返し配列（システムを構成する部分）の一方または両方の一部または全部が標的遺伝子を認識し得る配列の一部に含まれる場合があってもよい。

なお、標的遺伝子を特定する被検出配列とは、実際にプローブとのハイブリダイゼーション反応に用いられる分子が含む配列である。この被検出配列は、検出したい標的遺伝子そのものでもよいし、標的遺伝子中に含まれるその標的遺伝子に特有の部分の相補配列でもよい。このような部分配列は、単離した遺伝子から直接得られる断片でもよいし、標的遺伝子の塩基配列から選択した部分配列に基づいて合成されたものでもよい。

このような二本鎖システム構造と一本鎖ループからなる構造は、一般にヘアピン構造とも呼ばれるが、その構造の安定性は、プローブ分子がDNAやRNAの場合、分子内二本鎖形成にかかわる相補的繰り返し配列の種類と長さの他、該プローブが存在する緩衝液の温度や塩濃度によって影響を受ける。例えば、27塩基からなるオリゴヌクレオチド分子における、5'-TTGAG-3' / 5'-CTCAA-3' なる5塩基の相補的な逆向き繰り返し

し配列の場合、分子内二本鎖形成にかかわる T_m 値は、50 mMのNaClを含む緩衝液中では、実測値に基づき、約54℃と推定される。プローブ分子と標的遺伝子との二本鎖形成における T_m 値は、標的遺伝子の認識配列の種類と長さによって決まり、該配列が20mer以下のときは、Wallaceの法則に従い、 T_m 値は次式により近似的に与えられる。 $T_m(℃) = 2 \times (A \text{ また } T \text{ の数}) + 4 \times (G \text{ または } C \text{ の数})$ 。20merより大きな配列の場合は、Nearest-neighbor 法等、いくつかの計算法が適用されている。

本発明の遺伝子検出用プローブによって標的遺伝子の存在を検出する場合、プローブ分子と標的遺伝子との二本鎖形成における T_m 値は、プローブ分子内の二本鎖形成における T_m 値と同じかそれ以上に設定することが好ましい。標的遺伝子の認識配列の好ましい長さは15から18merであるが、目的に応じてこれより短いものや、長いものも利用可能である。

本発明の標的遺伝子の分析方法では、プローブ単独ではヘアピン構造が維持され、被検出配列を有する分子とプローブとがハイブリダイズした場合にヘアピン構造が解消される条件で試料とプローブとの反応を行う。

緩衝液の塩濃度については、プローブ分子がDNAやRNAである場合は、ハイブリダイゼーションに影響する。陽イオンの存在により二本鎖が安定化されるため、一般に高いイオン強度の場合は T_m 値が高くなる。一方、プローブ分子がペプチド核酸から成る場合は、イオン強度の影響は少なくなる。

本発明の遺伝子検出用プローブにおいて、標的遺伝子の認識配列をデザインする場合、標的遺伝子そのものの塩基配列、または標的遺伝子が属する遺伝子ファミリーのコンセンサス配列などの配列情報が必要である。配列情報の中から、適切な T_m 値をもった認識配列を選び出す作業は、目視によっても可能であるが、市販のプライマー設計プログラム、または公共機関等が提供するオンラインのプログラム、例えば Oligo Calculator (<http://mbcf.dfci.harvard.edu/docs/oligocalc.html>) などが利用可能である。

これに対し、相補的な逆向き繰り返し配列は標的遺伝子とは関係なく任意に設定が可能である。一般には、安定なヘアピン構造の形成に寄与する配列

であること、標的遺伝子の認識配列に対して相補性のない配列であること、分子内二本鎖形成における T_m 値が、標的遺伝子との二本鎖形成における T_m 値と同じか、またはそれより低い値を与える配列であることが好ましいが、目的によっては、該繰り返し配列の一方または両方について、その一部または全部が標的遺伝子の認識配列の一部に含まれる場合がある。

各種のプライマー設計プログラムの多くは、分子内二本鎖の形成のしやすさを計算することが可能であるので、配列決定の目安として利用が可能である。

本発明の標的遺伝子検出用プローブでは、酸化還元性ユニットは二本鎖システムを形成している状態において、この二本鎖システムを構成する一方の鎖に結合させる。また、二本鎖システムを構成する二本の鎖が二本鎖システムの一本鎖ループと反対側に二本鎖システムからの延長部分を有する場合は、この延長部分の一方に酸化還元性ユニットを結合させてもよい。例えば、酸化還元ユニットは、次のa) 及びb) のいずれかの位置に含まれることが好ましい。

a) 二本鎖システムと一本鎖ループからなる閉じた構造の形成に際して、二本鎖システムを構成するいずれか一方の鎖上。

b) 直鎖状の核酸またはこれに類似した分子のいずれかの末端。

本発明の遺伝子検出用プローブは、単独では二本鎖システムと一本鎖ループからなる閉じた構造を取りえるが、標的遺伝子を特定するための被検出配列が存在する条件では該被検出配列と二本鎖を形成することにより開いた構造となることを特徴とする。このような標的遺伝子の認識の前後において、構造的に最も大きく変化するのは二本鎖システムを形成する領域である。本発明においては、このような構造的な変化を電気的な信号の変化として利用することを特徴とする。したがって、酸化還元性ユニットは、本発明の遺伝子検出用プローブにおいて、二本鎖システムを形成する一方の鎖上に含まれることが好ましく、このような方法としては、互いに相補的な逆向き繰り返し配列の一方の繰り返し単位上に配置するのが好ましい。本発明の遺伝子検出用プローブでは、互いに相補的な逆向き繰り返し配列をプローブの両末端に配

置ることが好ましいため、プローブを構成する直鎖状の核酸またはこれに類似した分子のいずれかの末端に酸化還元性ユニットを含むことがより好ましい。ここで、「末端」とは、厳密に末端である必要はなく、ヌクレオチド単位で3～5個分の幅が許容される。すなわち、分子の末端から5番目のヌクレオチドに酸化還元性ユニットを結合させたような場合も「末端」に含むものとみなす。また、目的に応じて直鎖状の核酸またはこれに類似した分子の末端にリンカー分子等を結合させた場合は、該リンカー中に酸化還元性ユニットを含ませてもよい。

酸化還元性ユニットがプローブ分子中に含まれる好ましい形態としては、直鎖状の核酸またはこれに類似した分子（核酸類似物）に直接、あるいはリンカー分子を介して、共有結合的に結合させる場合が挙げられるが、これに限定されない。

本発明の遺伝子検出用プローブに結合させる酸化還元性ユニットは、単独測定（プローブなどと結合していない状態での測定）において、+1.0～-1.0Vの酸化還元電位を有する物質であることが好ましい。さらに好ましくは、キノン及びその誘導体などのキノン化合物、フラビン及びその誘導体などのフラビン化合物、ポルフィリン及びその誘導体などのポルフィリン化合物、フェロセンなどのメタロセン化合物に代表される有機金属錯体、金属及び金属化合物から選択したものをを用いることができる。キノン化合物としては、アントラキノン及びピロロキノリンキノンを挙げるができる。必要に応じて、1つのプローブに複数の酸化還元性ユニットを結合させてもよい。

本発明の代表的な遺伝子検出用プローブについてその模式的構造及び一般的な化学式を図1に示す。化学式においてNは任意のヌクレオチド、Aはアデノシンヌクレオチド、Uはウリジンヌクレオチドを夫々示す。Redoxは酸化還元性ユニットを示す。図中の1はプローブ分子本体を示し、2及び8は相補的な逆向き繰り返し配列を示す。また、3は標的遺伝子の認識配列であり、ヘアピン構造の形成において一本鎖ループをなす。10がオリゴヌクレオチドからなる分子であるのに対し、9は6-メルカプトヘキサノー

ルからなるリンカーを示している。4に示す酸化還元性ユニットは、ウリジンヌクレオチドのウラシル塩基に共有結合していることを示している。

プローブ分子（本発明の遺伝子検出用プローブの酸化還元性ユニットを含まない部分）がDNAまたはRNAから成る場合は、市販のDNA/RNA合成機によりこれを合成することが可能である。DNAまたはRNAヌクレオチドに類似した各種の修飾ヌクレオチドを含む核酸から成る場合についても多くの場合、市販のDNA/RNA合成機を利用して合成することが可能である。

プローブ分子にペプチド核酸を含む場合は、ペプチドと同様に液相法や固相法によって合成することができ、合成されたものは市販もされている。ペプチド核酸の合成法については、特表平6-509063号の明細書、米国特許2758988号の明細書、P.E.Nielsen et al., Journal of American Chemical Society, 114, 1895-1987(1992)、P.E.Nielsen et al., Journal of American Chemical Society, 114, 9677-9678(1992)などに詳細が記載されている。

図2に、本発明の代表的な電気化学的遺伝子検出法について説明する。本発明におけるもっとも好ましい遺伝子検出の形態は、本発明の遺伝子検出用プローブを電極表面に固定した状態で行うものであり、さらに好ましくは、複数種の遺伝子検出用プローブを担体または基板上に配置した電極に固定したDNAチップの状態で行うものである。

図2において、プローブ分子は9の6-メルカプトヘキサノールからなるリンカーの末端に位置する6のチオール基を介して5の電極表面に結合している。標的遺伝子7を認識することによりヘアピン構造が開いて、7と1からなる二本鎖が形成される。このような構造変化に伴い、4の酸化還元性ユニットは電極表面からの距離を変化させ、該距離の変化が電流値の変化として測定されることになる。

本発明の「標的核酸検出用のチップ」とは、適当な担体、例えば基板や各種形状の基体の表面に配置した電極表面に単一種、または複数種からなる本発明の遺伝子検出用プローブを固定したものをいい、複数種のプローブを用

いる場合は、単一の電極にこれらを固定してもよいし、あるいは各々のプローブの位置情報がトレースできるように整然と配置された状態で、個別の電極に固定する方法が利用できる。

複数の異なるプローブを用いる場合は、異なる標的遺伝子を認識する異なる複数のプローブ毎に酸化還元ユニットの電気応答性を変えることで、得られる電気応答性から、どのプローブに被検出配列がハイブリダイズしたかを検出することができ、被検出配列とハイブリダイズしたプローブの標的遺伝子認識配列に関する情報に基づいて標的遺伝子を特定することができる。例えば、第1及び第2の2つの標的遺伝子を検出できる系を得るには、第1の標的遺伝子を特定できる第1の被検出配列を有する核酸分子と相補的な配列を有する第1のプローブと、第2の標的遺伝子を特定できる第2の被検出配列を有する核酸分子と相補的な配列を有し、第1のプローブと電気応答の異なる酸化還元ユニットを有する第2のプローブとを、単一電極、またはそれぞれ独立した2つの電極に、領域を分けて固定し、試料と反応させる。試料中に第1の被検出配列を有する核酸分子が存在する場合は、第1のプローブの有する酸化還元ユニットの電気応答の変化により第1の標的遺伝子の検出が可能となり、試料中に第2の被検出配列を有する核酸分子が存在する場合は、第2のプローブの有する酸化還元ユニットの電気応答の変化により第2の標的遺伝子の検出が可能となる。試料にこれらの第1及び第2の被検出配列を有する核酸分子の両方が存在する場合は、第1のプローブの有する酸化還元ユニットの電気応答の変化と、これと異なる第2のプローブの有する酸化還元ユニットの電気応答の変化と、に基づいて第1及び第2の標的遺伝子の検出が可能となる。

本発明のDNAチップでは、本発明の遺伝子検出用プローブが、次のc)及びd)のいずれかの部位と電極表面との結合により、電極表面に固定されていることが好ましい。

c)二本鎖ステム部分と一本鎖ループ部からなる閉じた構造の形成に際して、二本鎖ステムを構成する二本の鎖のうち、酸化還元性ユニットを含まない一方の鎖。

d) 直鎖状の核酸またはこれに類似した分子の酸化還元性ユニットを含まない末端。

本発明の遺伝子検出用プローブは、単独では二本鎖ステム部分と一本鎖ループ部からなる閉じた構造を取るが、標的遺伝子を特定する被検出配列が存在する条件では該標的遺伝子と二本鎖を形成することにより開いた構造となることを特徴とする。本発明のDNAチップでは、標的遺伝子の認識の前後において、酸化還元性ユニットの電極に対する距離の変化を電流値として読み取ることにより、遺伝子検出を行うことを特徴とする。従って、当該距離の変化が最も大きくなるようにプローブを固定することが好ましく、このためには、二本鎖ステムを構成する二本の鎖のうち、酸化還元性ユニットを含まない一方の鎖か、プローブを構成する直鎖状の核酸またはこれに類似した分子の酸化還元性ユニットを含まない末端を電極に固定することが好ましい。ここでも「末端」とは厳密に末端である必要はなく、ヌクレオチド単位で3～5個分の幅が許容される。また、目的に応じて直鎖状の核酸またはこれに類似した分子の末端にリンカー分子等を結合させた場合は、該リンカーと電極表面とを結合させることによって固定することができる。図1に示すプローブの場合、ヌクレオチド鎖の3'端に結合させた6-メルカプトヘキサノールのSH基を電極表面に結合させることにより固定を行う。

図3に示すように、複数種のプローブを単一の電極に固定して用いる方法は、本発明の特徴というべき方法であって、標的遺伝子の異なる複数のプローブのそれぞれについて、電気的応答の互いに異なる酸化還元性ユニットを用いることによって為し得るものである。

たとえば、標的遺伝子が互いに異なるプローブ1及びプローブ2に対して、それぞれアントラキノン及びフェロセンからなる酸化還元性ユニットを用いた場合、ディファレンシャルパルスボルタモグラフィーにおけるヘアピン状態での電流値のピークは、プローブ1では-0.5V付近、プローブ2では+0.3V付近に見られる。従って、これらプローブが同一電極上に固定されていても、測定条件を個々に変えることなく、それぞれのプローブに対応するピーク電流値を読み取ることにより、標的遺伝子1あるいは標的遺伝

子2を相互に識別して検出することが可能である。

このような単一電極型・多元解析用DNAチップは、チップの構造を単純なものとし、チップの作成コストや測定にかかるコストを低くできるものと期待される。

本発明の電気化学的遺伝子検出用法に用いられる電極の材料としては、グラファイト、グラシーカーボン等の炭素電極、白金、金、パラジウム、ロジウム等の貴金属電極、酸化チタン、酸化スズ、酸化マンガン、酸化鉛等の酸化物電極、Si、Ge、ZnO、CdS等の半導体電極、チタンなどの電子伝導体を挙げることができるが、金もしくはグラシーカーボンを用いることが特に好ましい。これらの電子伝導体は、導電性高分子によって被覆されていても、単分子膜によって被覆されていてもよい。

電極を配置する担体としては、疎水性または低親水性の電気絶縁性の材料を用いることが好ましく、このような材料としては、ガラス、セメント、陶磁器等のセラミックスもしくはニューセラミックス、ポリエチレンテレフタレート、酢酸セルロース、ビスフェノールAのポリカーボネート、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等のポリマー、シリコン、活性炭、多孔質ガラス、多孔質セラミックス、多孔質シリコン、多孔質活性炭、繊維物、不織布、濾紙、短繊維、メンブレンフィルタ等の多孔質物質などを挙げることができるが、各種ポリマー、ガラスもしくはシリコンであることが特に好ましい。これは、表面処理の容易さや電気化学的方法による解析の容易さによるものである。電気絶縁性の担体または基板の厚さは、特に限定されない。

電極を担体または基板に複数配置する場合、各電極は、互いに接しないように、かつ規則的に該担体または基板の上に配置されていることが好ましい。電極を設ける前に、該担体または基板上に、電荷を有する親水性の高分子物質からなる層や架橋剤からなる層を設けてもよい。このような層を設けることによって該担体または基板の凹凸を軽減することができる。また、担体または基板の種類によっては、その物質中に電荷を有する親水性の高分子物質を含ませることも可能であり、このような処理を施した担体または基板も好ましく用いることができる。

電極表面へのプローブの固定法としては、種々の方法が利用可能であるが、共有結合を介したものが好ましい。このような固定法として、プローブの末端をチオール基を含む化合物、例えば 6-メルカプトヘキサノールで修飾しておき、活性化した金電極の表面にチオール結合により固定する方法が挙げられる。このような結合の際、プローブ分子と電極表面の活性基との間に適当な大きさのスペーサー分子を介在させることも可能である。

プローブ分子の固定は、プローブ分子が溶解あるいは分散されてなる水性液を電極表面上に点着して行うことが好ましい。プローブ分子を含む水性液中には、その水性液の粘性を高める添加剤を含有させてもよい。このような添加剤としては、ショ糖、ポリエチレングリコール、グリセロール等を挙げることができる。点着後、所定の温度でそのまま数時間放置するとプローブ分子が固定される。点着は、マニュアル操作によっても行うことができるが、汎用されているDNAチップ作製装置に装備されたスポットを用いて行うこともできる。点着後は、インキュベーションを行ってもよい。インキュベート後、未固定のプローブ分子を洗浄して除去することが好ましい。

上記のようにして作成されたDNAチップは、検査対象となる核酸に対して直ちに使用することができる。

本発明においては、遺伝子検出用プローブにおける標的遺伝子の認識配列を変えることにより種々の遺伝子の検出を行なうことができる。食品分野では、食品中に含まれる微生物の全体もしくはその一部の塩基配列に相補的な配列を認識配列とする遺伝子検出用プローブを用いた場合には、食品中に含まれる微生物の直接検出を行なうことができ、食品衛生検査が可能になる。このような食品中に含まれる微生物としては、例えば、病原性の大腸菌、ブドウ球菌、サルモネラ菌を挙げることができる。

農林水産業分野では、作物、畜産動物、魚類の病原性微生物もしくはウイルスの検出や、農産物、畜産物の産地や銘柄の検定等に利用可能である。また、遺伝子組換え作物や畜産物の検出にも利用可能である。植物ウイルスもしくはウイロイドの一部の塩基配列に相補的な配列を認識配列としたプローブを用いた場合には、植物に感染した植物ウイルスもしくはウイロイドの

検出を行なうことができ、農業分野における感染症診断が可能になる。このような植物ウイルスもしくはウイロイドとしては、例えば、タバコモザイクウイルス、カリフラワーモザイクウイルスを挙げることができる。畜産動物や魚類に感染する病原性微生物もしくはウイルスの全体あるいはその一部の塩基配列に相補的な配列を認識配列とするプローブを用いた場合には、魚類に感染する病原性微生物もしくはウイルスの検出を行なうことができ、畜産分野や水産分野における感染症診断が可能になる。このような病原性ウイルスや微生物としては、例えば、口蹄疫ウイルスや病原性ピブリオを挙げることができる。

医療分野では、人体に感染し、感染症等を引き起こす病原性微生物もしくはウイルス、遺伝病の原因遺伝子、活性化プロトオンコジーン等の検出が可能である。核酸プローブとして人体に感染し、感染症等を引き起こす病原性微生物もしくはウイルスの全体あるいはその一部の塩基配列に相補的な配列を認識配列とするプローブを用いた場合には、感染症診断が可能になる。このような人体に感染して感染症等を引き起こす病原性微生物としては、例えば、病原性微生物であるストレプトコッカス、マイコプラズマ、クロストリジウム、クラミジア、サルモネラ、単純ヘルペス、サイトメガロウイルスを挙げることができる。

遺伝病の原因遺伝子の全体もしくはその一部の塩基配列に相補的な配列を認識配列とするプローブを用いた場合には、遺伝病の直接検定が可能になる。このような遺伝病の原因遺伝子としては、例えば、アデノシンデアミナーゼ欠損症、鎌形赤血球貧血の原因遺伝子を挙げることができる。

活性化プロトオンコジーンの全体もしくはその一部の塩基配列に相補的な配列を認識配列とするプローブを用いた場合には、癌診断が可能になる。このような活性化プロトオンコジーンとしては、例えば、癌遺伝子データブック（渋谷正史、秀潤社）に記載の癌遺伝子を挙げることができる。

遺伝病の原因遺伝子や、他の病気への罹りやすさ、薬の利きやすさ等については、遺伝子上の一塩基多型（SNP）によって決定される場合がある。このような遺伝子の検出においては、当該遺伝子そのものの存在や遺伝子の

発現量について検出するのではなく、検体ごとにことなる遺伝子上のわずかな構造上の差異について識別することが必要である。本発明では、より厳密なハイブリダイゼーションの条件を用いることにより、検体におけるSNPの有無を検出することが可能である。

本発明の遺伝子検出方法では、まず、検査対象となる核酸を各種材料や生体組織からの抽出操作等により調製する。生体組織からDNAを調製する場合、試薬メーカー等が提供する各種のDNAキット、例えば、血液からの調製に適したGet pureDNA Kit - Blood（同仁化学社製）や、毛髪からの調製に適したISOHAIR（ニッポンジーン社製）等が利用可能である。調製された核酸は必要に応じて、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）などにより増幅したり、RNAの場合は逆転写反応により対応するDNAに変換して用いることができる。

次に、DNAチップを用いて上記操作で得た核酸と本発明の遺伝子検出用プローブとのハイブリダイゼーションを行う。本発明では、ハイブリダイゼーションの前に、核酸を標識する等の化学的な処理を必要としないが、核酸試料が二本鎖DNAの場合は、熱処理によって変性し、一本鎖としてハイブリダイゼーションに用いることが好ましい。ハイブリダイゼーションは、本発明の遺伝子検出用プローブに、核酸が溶解あるいは分散してなる試料溶液を接触させることによって実施する。ハイブリダイゼーションは、20～40℃の温度範囲で、そして1～24時間の範囲で実施することが好ましいが、電極に固定するプローブ分子の鎖長、試料核酸の種類などに応じて、ハイブリダイゼーションの最適条件を設定することが望ましい。ハイブリダイゼーション終了後は、洗浄を行い、未反応の試料核酸断片を除去することが好ましい。

本発明のDNAチップを用いた遺伝子検出法では、核酸試料とのハイブリダイゼーションの後、特別な操作を経ることなく直ちに、電流値の測定を行うことができる。電流量の測定は、電極と酸化還元性ユニットとの間を流れる電流量が測定できる方法であれば如何なる方法であってもよい。サイクリックボルタモグラフィ（CV）、デファレンシャルパルスボルタモグラフィ

(DPV)、リニアスweepボルタモグラフィ、ポテンシostat等を用いることが好ましい。カウンタ電極と遺伝子検出用プローブが固定された電極を電解質溶液に浸漬し、一对の電解系を形成させ、デファレンシャルパルスボルタモグラフィを測定することが特に好ましい。ファレンシャルパルスボルタモグラフィを測定することが特に好ましい。

DPVでは、プローブに用いた酸化還元性ユニットの酸化還元電位に従い、プローブに固有の電位でのピーク電流が得られる。このピーク電流は、プローブがヘアピン構造をとっている時に最大であり、プローブと標的遺伝子が二本鎖を形成している時に最小となる。標的遺伝子ごとに電氣的応答の異なる酸化還元性ユニットを用いた、複数種の遺伝子検出用プローブを単一の電極に固定したDNAチップの場合は、個々のプローブごとにピーク電流を与える固有の電位が存在するため、DPVにおいてこれらの電位におけるピーク電流の変化をトレースすることにより、それぞれの標的遺伝子について検出を行うことができる。

なお、試料とプローブとの反応において未反応のプローブのヘアピン構造を維持し、標的配列と二本鎖を形成する反応系の溶媒、並びにプローブと標的配列との二本鎖形成の電流の変化に基づく検出における溶媒としては、1~100mMの $MgCl_2$ を含む中性から弱塩基性の緩衝液を用いるのが望ましい。10mM トリス-塩酸、1mMEDTA からなる緩衝液 (pH8.0) を用い、 $MgCl_2$ 濃度を 3~10mM の範囲で用いるのが特に望ましい。

実施例

[実施例1]

(1) アントラキノン修飾型ウリジンヌクレオチドの合成

合成ルートを図4に示す。

2-アントラキノンカルボン酸(和光純薬社製)より塩化チオニル処理により酸塩化物(化合物2)を得た。化合物2とプロパルギルアミン(1、和光純薬社製)とを(重量比1対1)1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(1当量、和光純薬社製)存在下、N,N-ジメチルホルムアミド中で4時間室温で攪拌して反応させ、抽出後、カラムクロ

マトグラフィーで精製し、生成物 3 (21%) を得た。

5-ヨード-2'-デオキシウリジン (4、シグマ社製) と 4, 4'-ジメトキシトリチルクロリド (東京化成社製) (重量比 1 対 1) をピリジン中で混合し、室温で 16 時間攪拌して反応させ、抽出後、カラムクロマトグラフィーで精製し、生成物 5 (65%) を得た。

生成物 3 と 5 (重量比 1 対 1) を (テトラキストリフェニルホスフィン) パラジウム (0.15 当量、和光純薬社製) 及びトリエチルアミン (1 当量、和光純薬社製) 存在下、N, N-ジメチルホルムアミド中で室温で 12 時間攪拌して反応させ、抽出後、カラムクロマトグラフィーで精製し、生成物 6 (74%) を得た。更に、生成物 6 と 2-シアノエチルテトライソプロピルホスホロジミアダイト (アルドリッチ社製) (重量比 1 対 1) をテトラソール (1 当量、同仁化学社製) 存在下、アセトニトリル中で室温で、1 時間攪拌して反応させ、得られた生成物 8 をそのまま DNA 合成に使用した。

(2) プロープ及び検体用オリゴヌクレオチドの作成

プロープ ODN 1 は、配列表の配列番号 1 に示すヌクレオチド配列 (TGAGTATCATCTTTGGTGTCTCTCAA) を持つ。本オリゴヌクレオチドを DNA 合成機で合成し、5' 末端には (1) で作成したアントラキノン修飾型ウリジンを付加した。合成物を精製した後、3' 末端に 6-メルカプトヘキサノールを付加させた。

ODN1 : 5'-U^{aq}TGAGTATCATCTTTGGTGTCTCTCAA-(CH₂)₆-SH-3'

ODN 2 ~ ODN 4 は配列表の配列番号 2 ~ 4 に示す配列からなり、それぞれ DNA 合成機により合成した。

ODN2 : 3'-CCAATAGTAGAAACCACAAAA-5' (WT) (配列番号 2)

ODN3 : 3'-CCTTTATTCATAATCTGTTGAA-5' (G178MU) (配列番号 3)

ODN4 : 3'-CCTATAGTAACCACAAAGGAA-5' (F508) (配列番号 4)

(3) プロープで修飾された金電極の作成

表面積 2 mm の金電極を 2 M 水酸化カリウム溶液中で 3 時間煮沸し、純水で洗浄した後、濃硝酸溶液に室温で 3 時間浸し、さらに純水で洗浄した。上記の処理をした金電極の表面に 1 μM の ODN 1 溶液を 1 μL 滴下し、ゴム

キャップをかぶせて室温で3時間放置した。その後、電極を軽く純水で洗浄し、1 mMのメルカプトヘキサノール1 μ Lを滴下し、ゴムキャップをかぶせて室温で3時間放置した。

(4) ハイブリダイゼーション

ODN 1を固定化した金電極上に50ナノモル相当のODN 2~4をそれぞれ含む、5 mMリン酸ナトリウム、50 mM塩化ナトリウム、pH 7.0の溶液を滴下し、室温で1時間放置することによりハイブリダイゼーションさせた。その後、緩衝溶液で軽く洗浄を行った。

(5) 電流値の測定

ディファレンシャルパルスボルタンメトリー(DPV)による測定は、ALS社製のモデル660A エレクトロケミカルアナライザーで行った。参照電極は飽和カロメア電極(SCE)、対極はプラチナ電極をそれぞれ用いた。測定は、5 mMリン酸ナトリウム、50 mM塩化ナトリウム、pH 7.0の溶液中、室温で行い、pulse periodを200 ms、scan rateを100 mV/s、pulse amplitudeを50 mV、pulse widthを50 msとした。それぞれの検体用オリゴヌクレオチドについて、2回ずつの測定を行い、値を平均化した。

プローブODN 1における認識配列と完全にマッチする配列を含むODN 2を検体として用いた場合のDPV結果を図5に示す。検体を加えない状態(ヘアピン)で認められたピーク電流値が、検体を加えた状態(WT)では顕著に減少していることがわかる。

一方、プローブODN 1における認識配列とマッチしない配列からなるODN 3、ODN 4の場のDPV結果を夫々、図6、7に示す。いずれの場合も、検体を加えない状態(ヘアピン)及び検体を加えた状態(G178 MUまたはF508)共に電流応答が見られるが、検体を加えた状態において、電流量、ピーク値共に減少している。これは、検体の添加によって、プローブのヘアピン構造が多少の影響を受けていることを示唆するものと思われるが、ハイブリダイゼーションの条件を調整することにより、電流値の変化は抑えられるものと思われる。

図 8、9 には各検体ごとに、添加の前後における電流量、ピーク電流の変化を相対的に示した。これらの図からもわかるように、プローブにおける認識配列と完全にマッチする場合は、その認識の前後において顕著な電流応答の変化が認められる。マッチしない配列からなる検体の場合は、その認識の前後において電流値の変化がほとんどないことが望ましいが、本実施例におけるハイブリダイゼーションの条件では、プローブと検体との間での相互作用を排除することができなかったため、電流値の差異を生じたものと思われる。しかしながら、図に示される電流値の差異があれば検出には支障はない。

[実施例 2]

(1) フラビン類縁体修飾型プローブの作成

酸化還元性ユニットとしてフラビン類縁体を含む ODN5 を合成した。

ODN5 : 5' -¹¹TA GCGAAATAAGTATTAGACAACCGCTA-(CH)₆-SH-3'

フラビン類縁体は、Ikeda ら、Tetrahedron Letters 42、2529 (2001) に示した方法で合成した。

自動 DNA 合成機により、3' 端 (サポートのヌクレオシド) より 2 番目に Thiol modifier C6 S-S (Glen Research 製) を導入し、5' 端に Amino modifier C2 dT (Glen Research 製) を導入する方法で配列番号 5 の配列 (TAGCGAAATAAGTATTAGACAACCGCTA) を有するオリゴ DNA を合成した。サポートからの切り出し、脱保護の後、20mM の N-ヒドロキシスクシンイミドで活性化されたフラビン類縁体を含む 50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH8.7) で、12 時間攪拌した。反応液を HPLC により精製することで、5' 端にフラビン類縁体が付加したオリゴ DNA を得た。さらに、これを 0.1 M の DTT 溶液中 (50 mM Na phosphate, pH 8.4) で 30 分間攪拌して S-S 結合の還元を行い、HPLC 精製することで、3' 端をヘキサントチオール化したオリゴ DNA (ODN5) を得た (図 10)。

(2) プローブで修飾された金電極の作成、ハイブリダイゼーション

実施例 1 に記載の方法で行った。

(3) DPV による電流値の測定は実施例 1 に記載の方法で行った。

プローブ ODN 5 における認識配列と相補的な ODN 3 (G178MU) を検体

として用いた場合のDPV結果を図12に示す。検体を加えない状態（ヘアピン）で認められたピーク電流値が、検体を加えた状態（G178MU）では顕著に減少していることがわかる。

一方、プローブODN5における認識配列と相補的でないODN2（WT）、ODN4（F508）を検体とした場合のDPV結果を夫々、図11、13に示す。いずれの場合も、検体を加えない状態（ヘアピン）及と検体を加えた状態（WTまたはF508）で電流応答がほとんど変化していない。

〔実施例3〕

実施例1で用いたアントラキノン修飾型プローブと実施例2で用いたフラビン修飾型プローブについて、遺伝子検出におけるS/N比を算出し比較した。ここでは、S/N比をハイブリダイゼーション前の電流量（ $A_{p_{before}}$ ）からハイブリダイゼーション後の電流量（ $A_{p_{after}}$ ）を引いた値をハイブリダイゼーション前の電流量（ $A_{p_{before}}$ ）で割った値として定義した。算定結果を表1及び図14に示した。

表 1. アントラキノン修飾型及びフラビン修飾型プローブを用いた遺伝子検出実験の S/N 比 (3 回測定した結果の平均値)

プローブ	酸化還元性 ユニット	検体	S/N $= (A_{p_{before}} - A_{p_{after}}) / A_{p_{before}}$
ODN1	アントラキノン	ODN2 (WT)	0.608
ODN1	アントラキノン	ODN3 (G178MU)	0.121
ODN1	アントラキノン	ODN4 (F508)	0.243
ODN5	フラビン	ODN2 (WT)	0.032
ODN5	フラビン	ODN3 (G178MU)	0.575
ODN5	フラビン	ODN4 (F508)	0.010

プローブの配列が異なるため一概には比較できないが、アントラキノン修飾型プローブに比較し、フラビン修飾型プローブの場合は、相補的な配列に対して S/N 比が高く、相補的でない配列に対して S/N 比が低い理想的な結果となった。

[実施例 4]

DNA 修飾電極を繰り返し使用した時の電流値の変化

実施例 2 で作成した ODN5 修飾電極を用いてハイブリダイゼーション/変性を繰り返し行い、電流値の変化を調べた。ODN5 修飾電極に対し、相補的なターゲットである ODN3 (G178MU)、または ODN2 (WT)、ODN4 (F508) を加えハイブリダイゼーションを行い、DPV により電流値を測定した。引き続き、電極を 90 % ホルムアミド / 10 % TE buffer 溶液に 1 分間浸し 2 本鎖状態を解離させ、TE buffer 中に 1 分間した後、DPV により電流値を測定した。上記の操作を 1 サイクルとして、10 サイクル繰り返した場合の電流値の結果を図 15 に示した。相補的なターゲットである ODN3 (G178MU) を用いた場合は、ハイブリダイゼーションの前後において、ヘアピン状態と二本鎖状態を反映した電流値が示され、サイクルを重ねてもこれらの値はほぼ一定であった。一方、プローブに相補的でない ODN2 (WT) または ODN4 (F508) を

用いた場合は、サイクルの後半で若干の電流値の低下が見られたものの、ハイブリダイゼーション／変性を反映した電流値の周期的な変化は見られなかった。以上のような結果から、本発明の遺伝子検出用プローブが固定された電極を用いることで、遺伝子の検出が再現性良く繰り返し行えることが示された。

産業上の利用可能性

本発明にかかる酸化還元ユニットを有するヘアピン型プローブ及びこれを利用した電気化学的遺伝子検出法を利用することにより、

- 1) 目的塩基配列や一塩基多型の検出、
- 2) 電気化学式標的遺伝子検出用チップ、
- 4) バイオセンサー

等を提供することができる。

請 求 の 範 囲

1. 標的遺伝子を認識し得る認識配列を含み、かつ核酸及び核酸類似物の少なくとも一方からなる直鎖状分子と、酸化還元性ユニットと、を有する標的遺伝子検出用のプローブであって、

単独では、二本鎖システムと一本鎖ループとからなり、該一本鎖ループが該二本鎖システムにより閉じられたヘアピン構造を形成し、標的遺伝子の存在を示す被検出配列と前記認識配列とが二本鎖を形成することにより、該ヘアピン構造が開かれて、該プローブの一部に被検出配列との2本鎖部分が形成されるために必要な配列を有し、かつ

前記酸化還元性ユニットは、前記ヘアピン構造が形成された場合に前記一本鎖ループ以外で結合または近接する二本の鎖の一方に結合していることを特徴とする標的遺伝子検出用のプローブ。

2. 前記ヘアピン構造を形成し得る配列が、互いに相補的な2つの逆向き繰り返し配列と、これらの繰り返し配列の間に設けられた被検出配列に相補的な配列からなる標的遺伝子認識配列と、を有する請求項1に記載の標的遺伝子検出用のプローブ。

3. 前記一本鎖分子の少なくとも一部がDNAまたはRNAである請求項1または2に記載の標的遺伝子検出用のプローブ。

4. 前記一本鎖分子の少なくとも一部がペプチド核酸である請求項1または2に記載の遺伝子検出用のプローブ。

5. 前記酸化還元性ユニットが、次のa)及びb)のいずれかの位置に含まれる請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子検出用のプローブ。

a) 前記二本鎖システムを構成する2つの鎖のいずれか一方の鎖。

b) 前記直鎖状の分子の一方の末端。

6. 酸化還元性ユニットが、キノン化合物、メタロセン化合物、フラビン化合物及びポルフィリン化合物、金属または金属化合物である請求項1～5のいずれかに記載の遺伝子検出用のプローブ。

7. 電極表面を有する担体と、該電極表面に結合した請求項1～6のいずれ

れかに記載の標的遺伝子検出用のプローブとを有する標的遺伝子検出用のチップであって、

前記ヘアピン構造が形成された場合に、前記一本鎖ループ以外で結合または近接する二本の鎖のうちの前記還元性ユニットが結合していない方の鎖の末端領域が前記電極と結合していることを特徴とする標的遺伝子検出用のチップ。

8. 異なる複数の標的遺伝子のそれぞれを特定し得る異なる複数のプローブが、各プローブごとに前記電極表面に固定され、かつ、前記複数の標的遺伝子ごとに電気的応答の異なる酸化還元性ユニットが各プローブに結合している請求項7に記載の標的遺伝子検出用のチップ。

9. 標的遺伝子をプローブを用いて検出する方法において、

請求項7に記載の標的遺伝子検出用のチップの電極表面に、該電極表面に固定された該プローブが前記ヘアピン構造をし得る反応系を形成する工程と、

該反応系中で、試料と前記プローブとを、該試料中に被検出配列が含まれている場合に、該プローブと該被検出配列とのハイブリダイゼーションにより二本鎖を形成させて、該プローブのヘアピン構造が開かれて一本鎖に変換し得る条件下で反応させる工程と、

該反応を経たチップの電極に電位を与え、得られた電流値に基づいて該プローブと該被検出配列とのハイブリダイゼーションの状態を判定する工程と

を有することを特徴とする標的遺伝子の検出方法。

10. 異なる複数の標的遺伝子を認識する複数のプローブを、それぞれのプローブごとに異なる電極に固定したプローブを用いる請求項9に記載の標的遺伝子の検出方法。

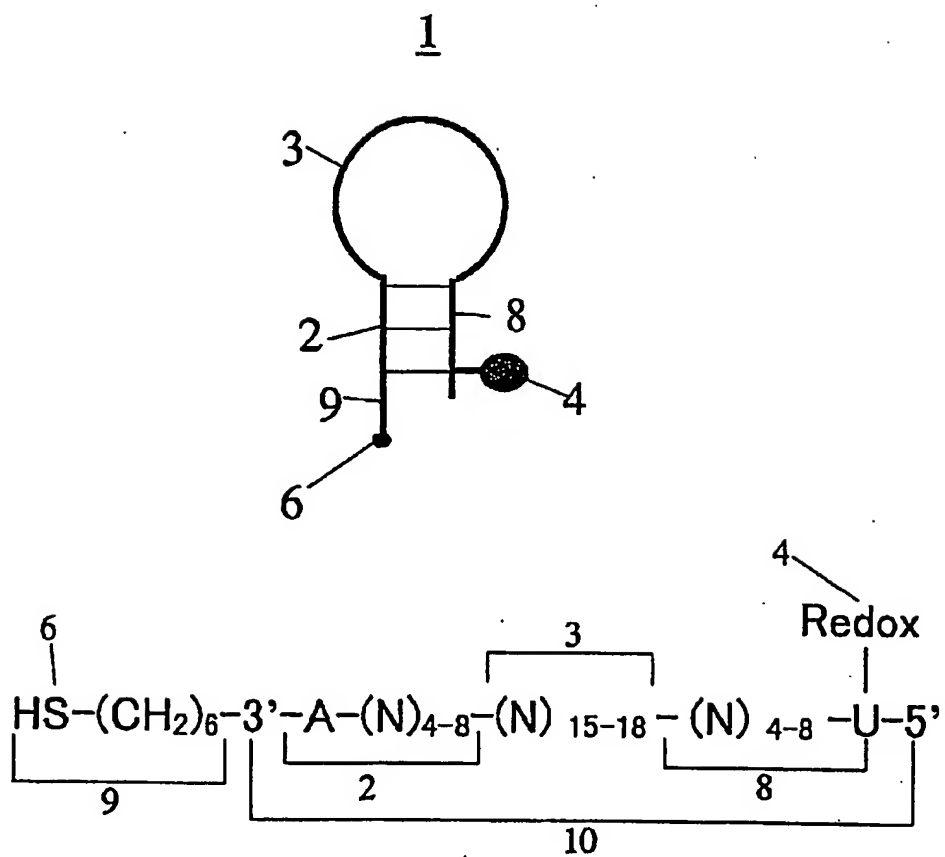
11. 標的遺伝子をプローブを用いて検出する方法において、

請求項8に記載の標的遺伝子検出用のチップの電極表面に、該電極表面に固定された該プローブが前記ヘアピン構造をし得る反応系を形成する工程と、

該反応系中で、試料と前記プローブとを、該試料中に異なる複数の標的遺伝子に対応する被検出配列の少なくとも1種が含まれている場合に、該プローブと該被検出配列とのハイブリダイゼーションによる二本鎖を形成させて、該プローブのヘアピン構造が開かれて二本鎖部分を持たない一本鎖に変換し得る条件下で反応させる工程と、

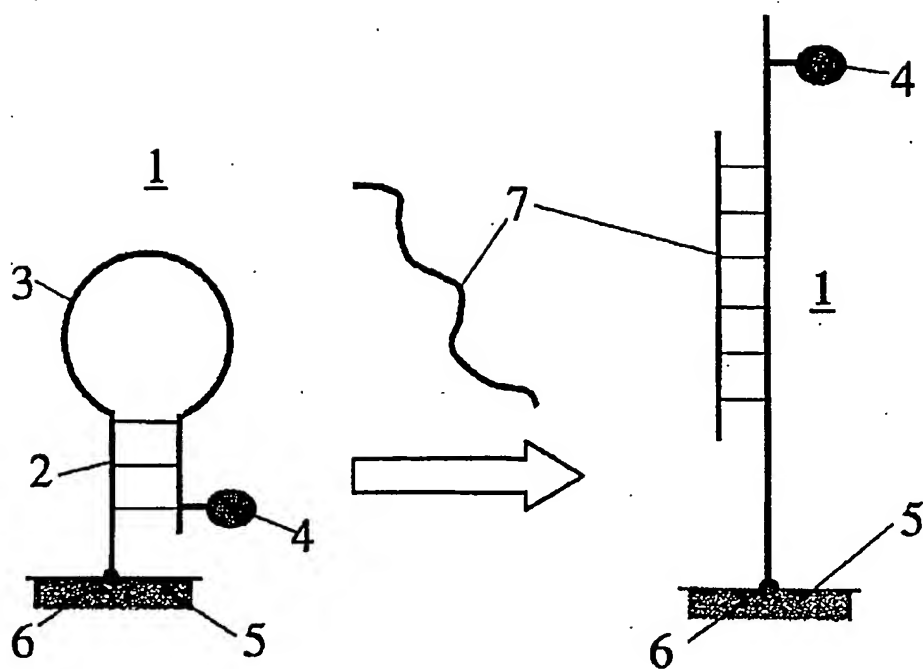
該反応を経たチップの電極に電位を与え、得られた電流値に基づいて該プローブと該被検出配列とのハイブリダイゼーションの状態を判定する工程と
を有することを特徴とする複数標的遺伝子の同時検出方法。

Fig. 1



BEST AVAILABLE COPY

Fig. 2



BEST AVAILABLE COPY

Fig. 3

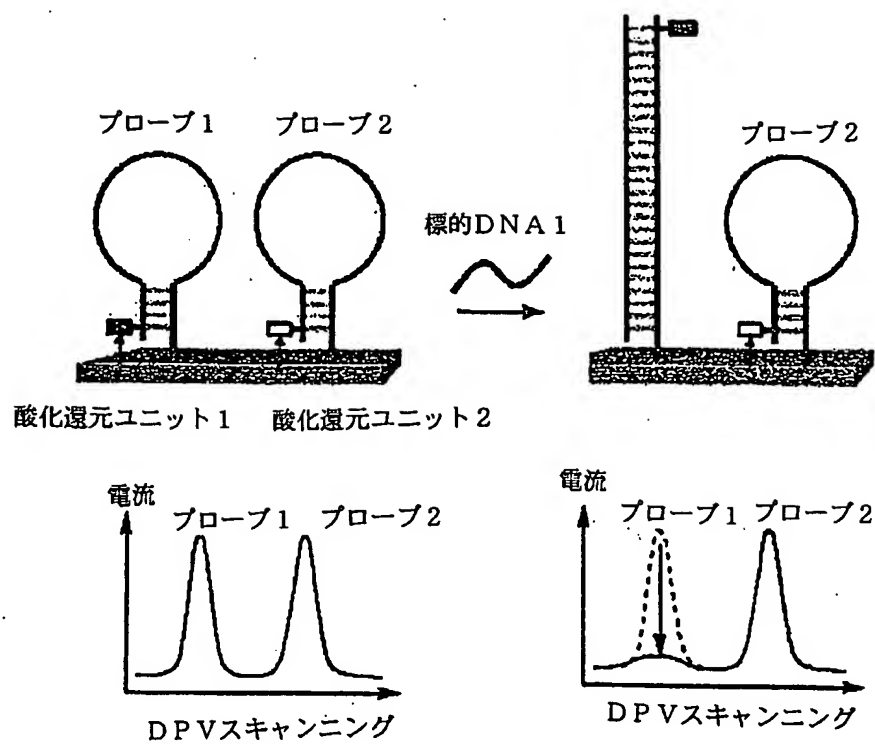


Fig. 4

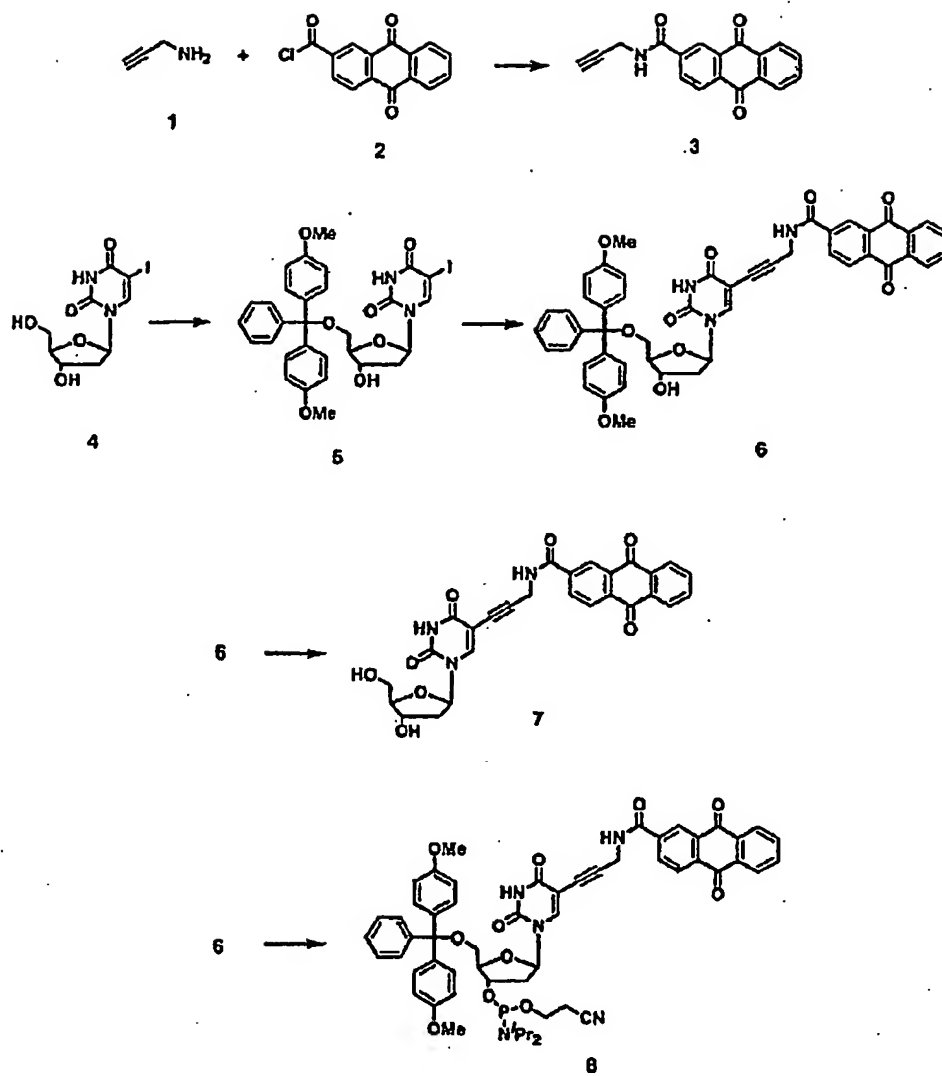


Fig. 5

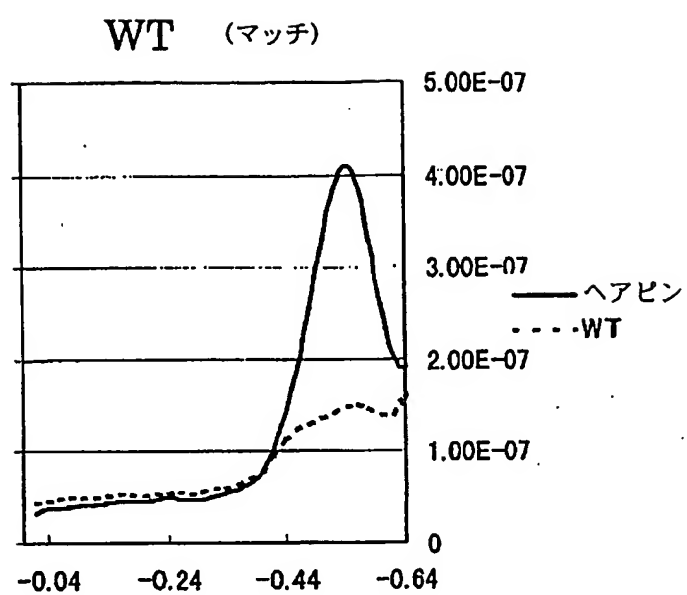


Fig. 6

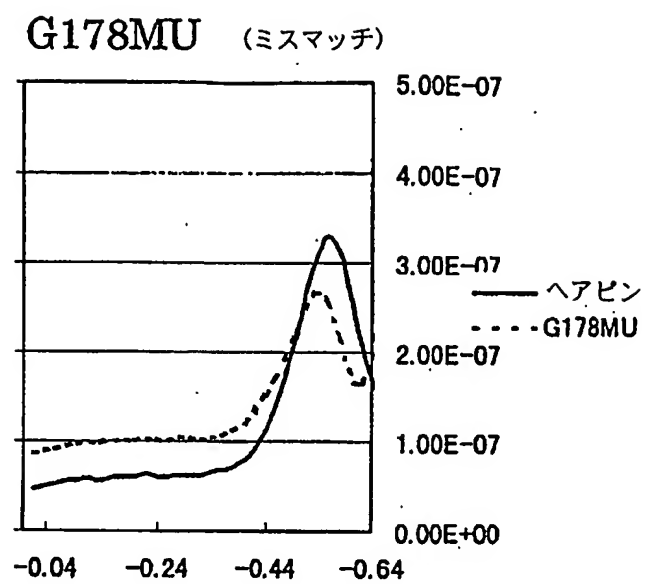


Fig. 7

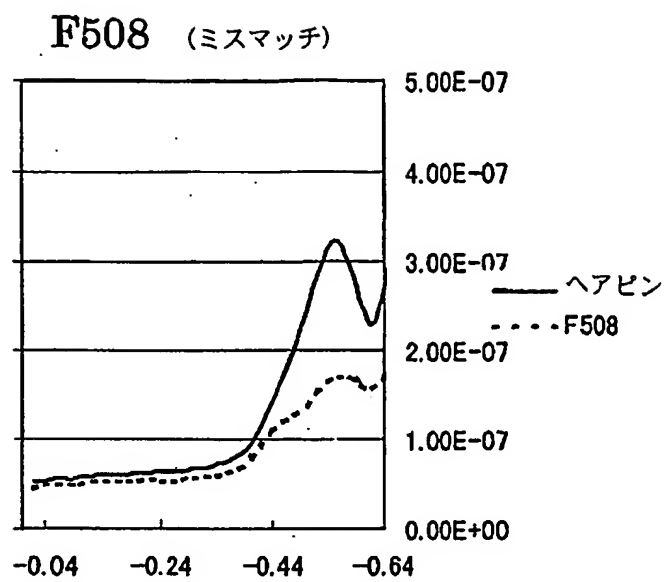


Fig. 8

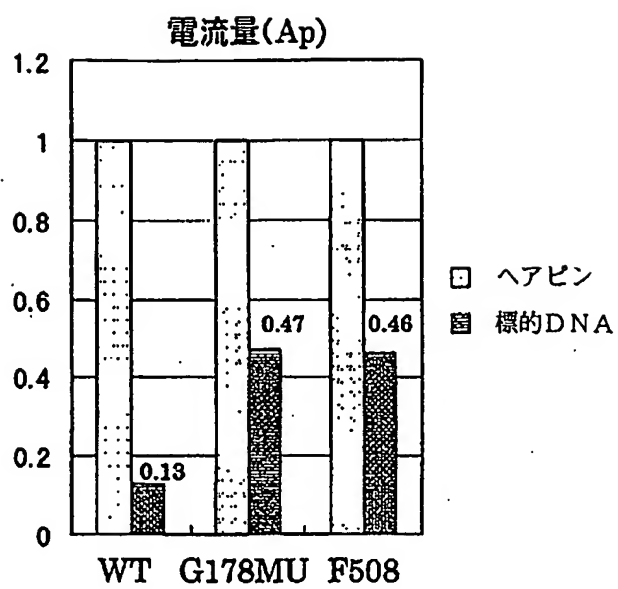
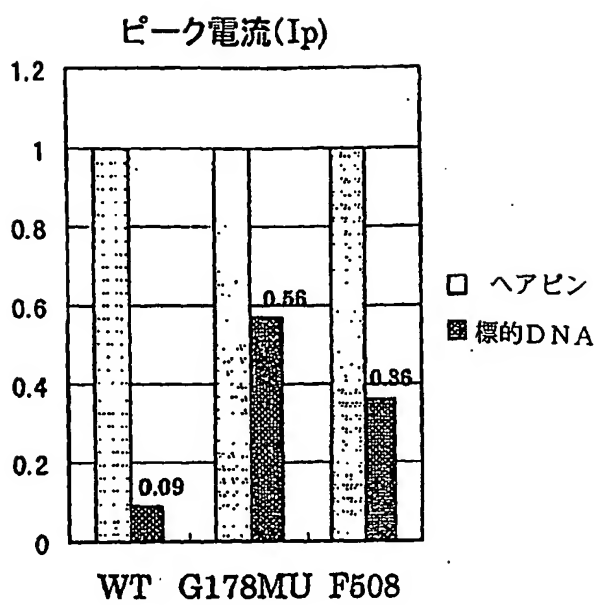


Fig. 9



BEST AVAILABLE COPY

Fig. 10

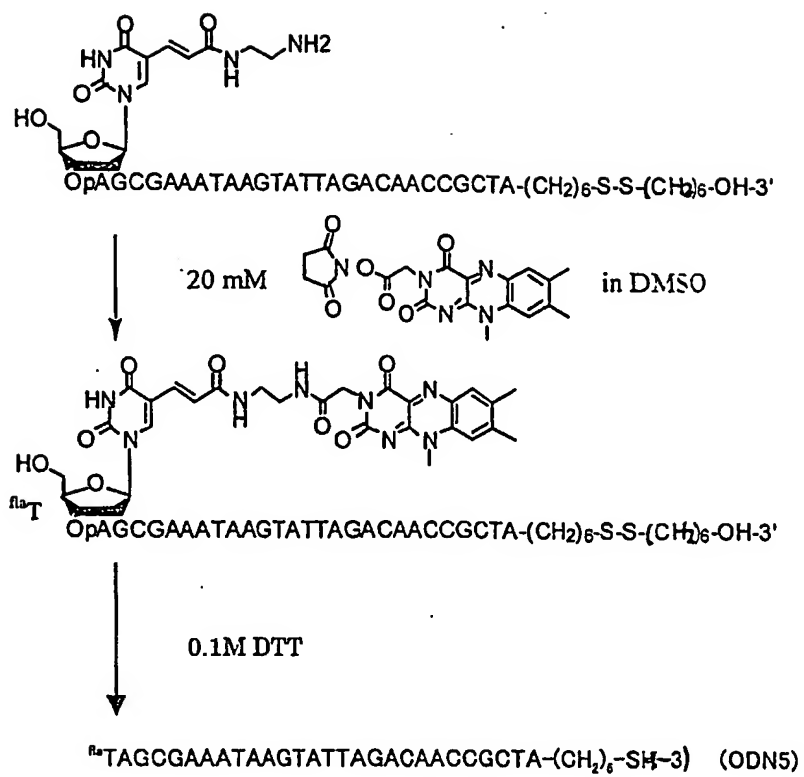


Fig. 11

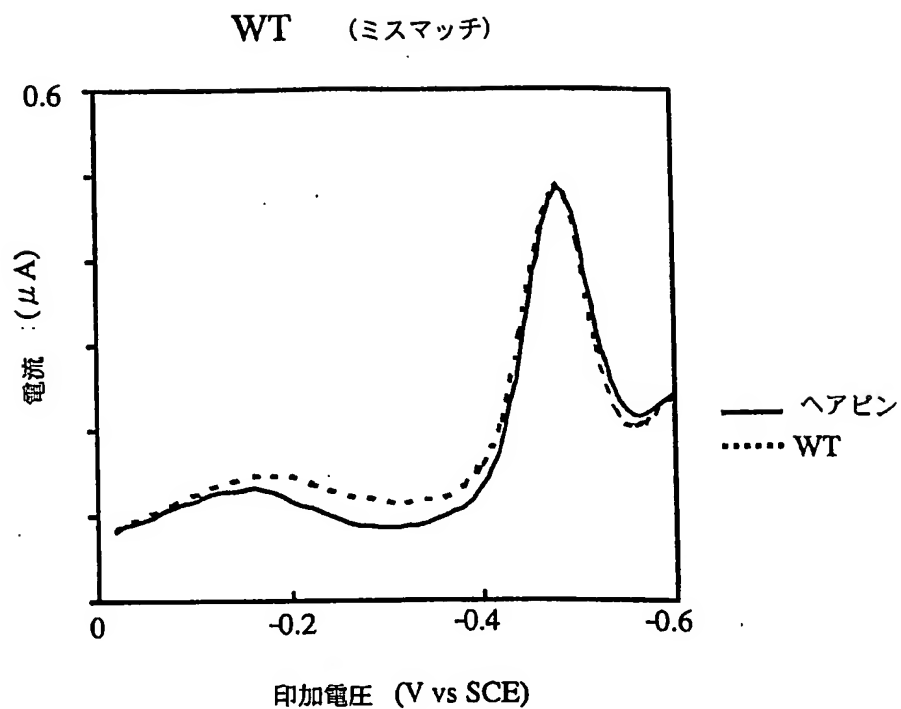


Fig. 12

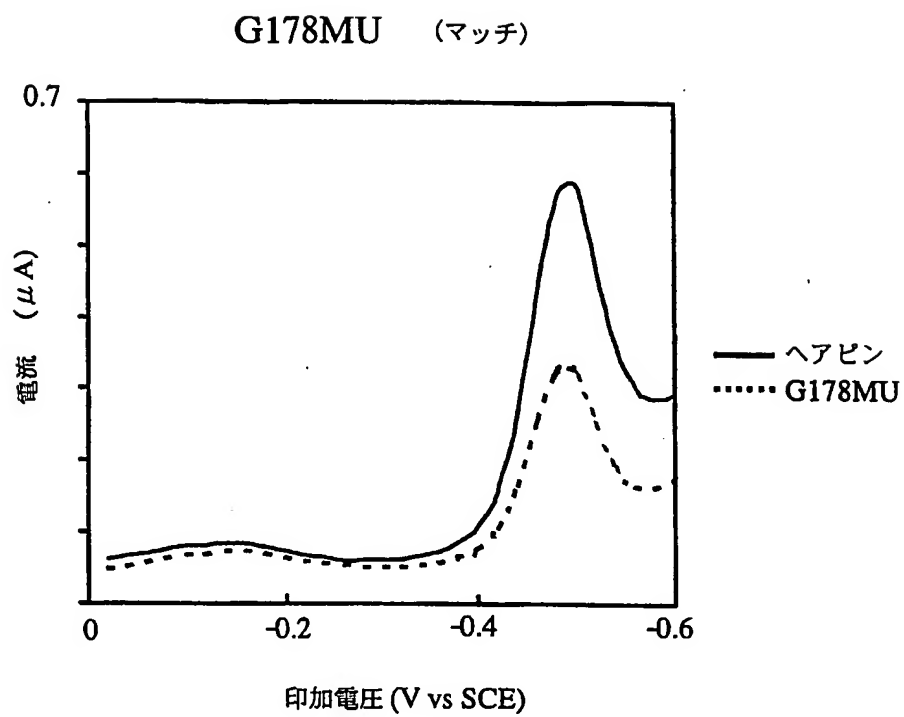


Fig. 13

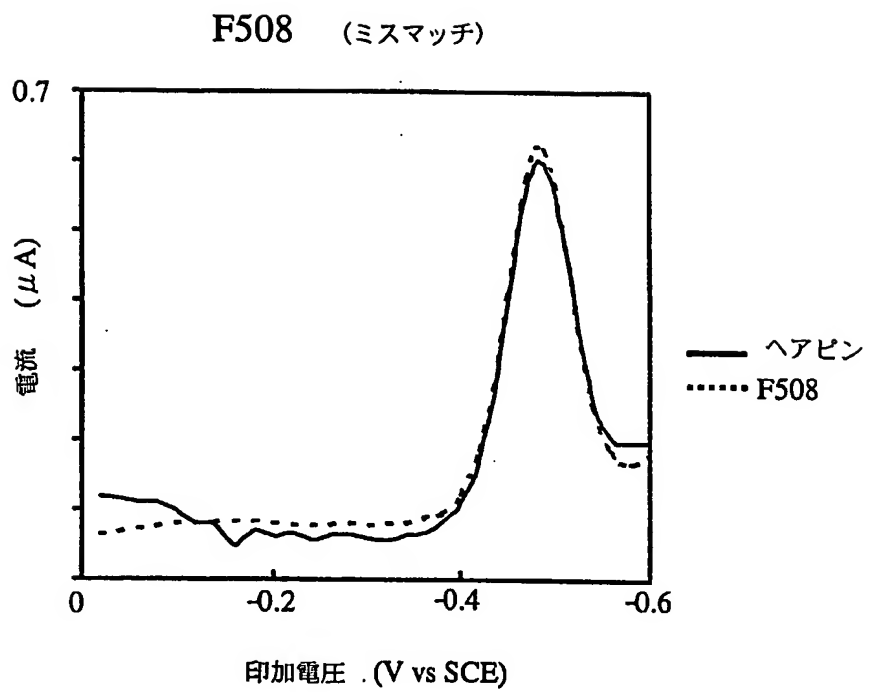


Fig. 14

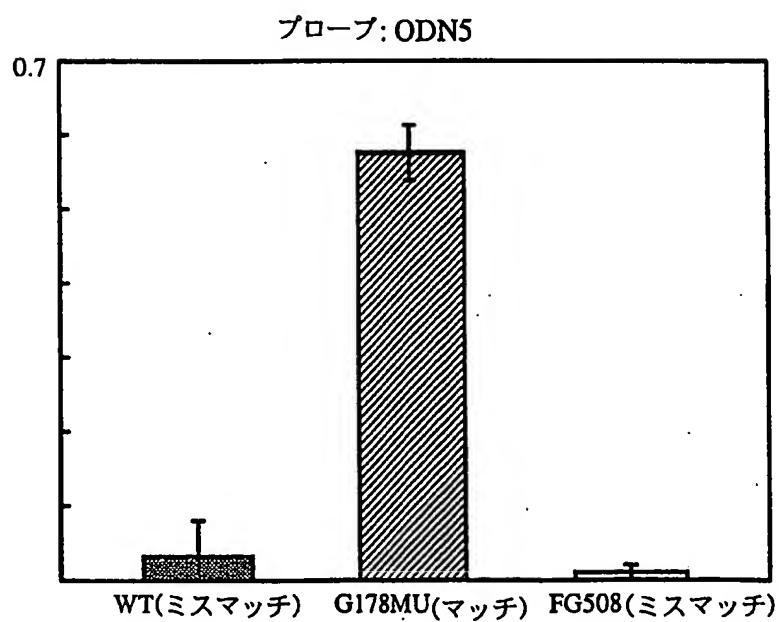
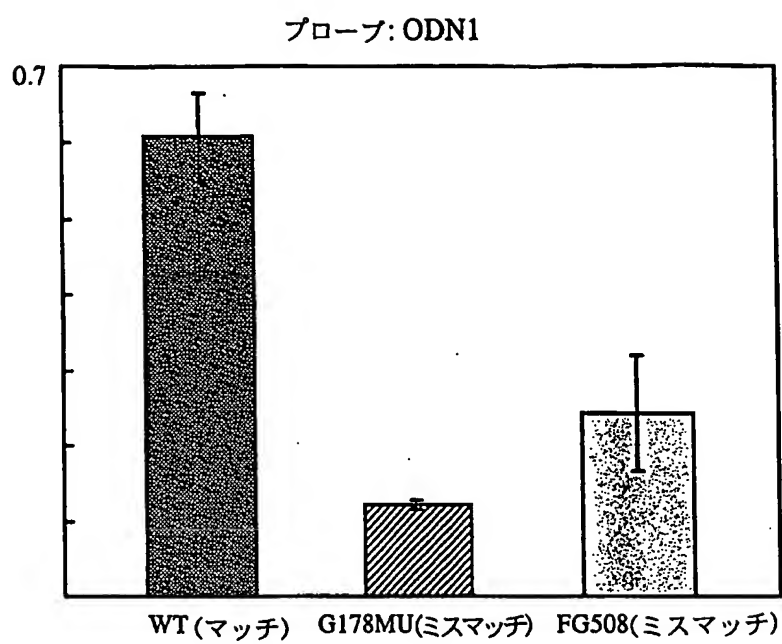
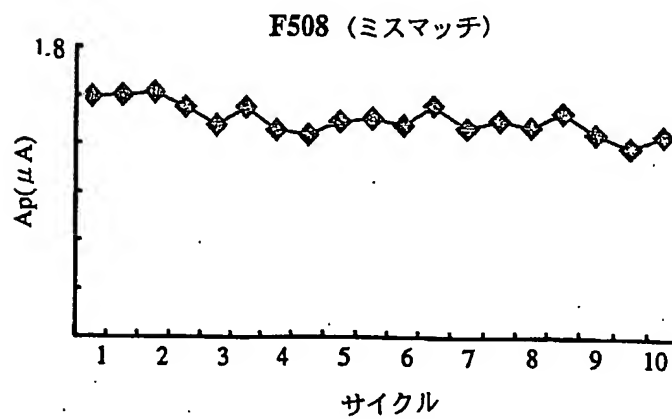
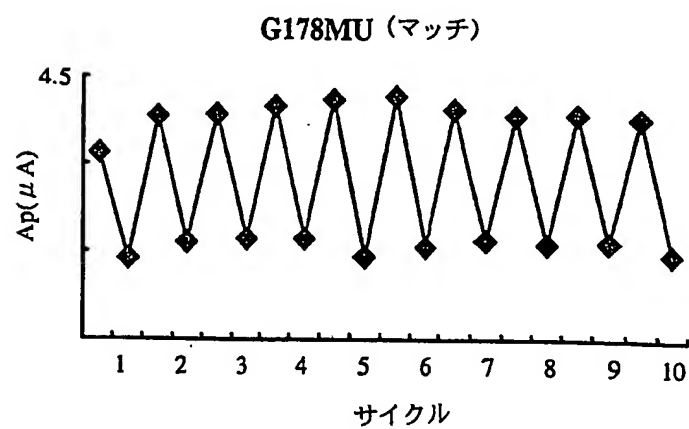
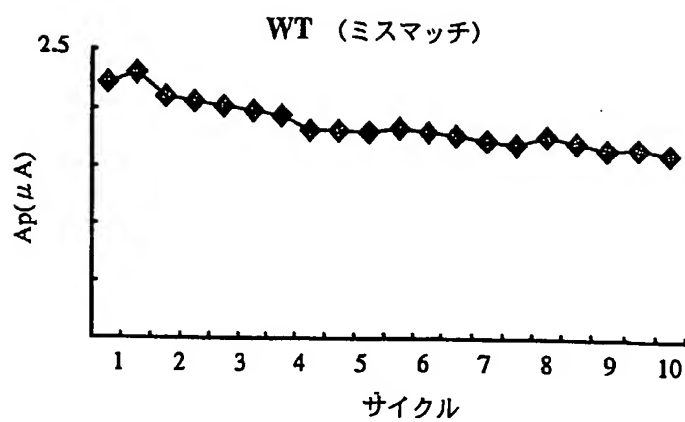


Fig. 15



BEST AVAILABLE COPY

SEQUENCE LISTING

<110> MITSUI CHEMICALS, INC.

<120> A probe DNA for detection of a gene and a electro-chemical method
for detection of the gene

<160>5

<210>1

<211>26

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223> probe DNA

<400>1

tgagtatcat ctttggtgtt tctcaa 26

<210>2

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223> sample DNA

<400>2

ccaatagtag aaaccacaaa a 21

<210>3

<211>22

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223> sample DNA

<400>3

cctttattca taatctgttg aa 22

<210>4

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>sample DNA

<400>4

cctatagtaa ccacaaagga a 21

<210>5

<211>28

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223> probe DNA

<400>5

tagcgaaata agtattagac aaccgcta 28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/13176

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	IMOOS E.C. et al., Characterization of immobilized DNA hairpins containing tethered redox probes, Abstracts Papers Am.Chem.Soc., 2002 August, Vol.224, No.1-2, INOR 104	<u>1-3</u> 4-11
A	TAKENAKA S. et al., Electrochemistry of ferrocenyl naphthalene diimide derivative and its behavior on hairpin DNA immobilized electrode, Denki Kagaku, 1998, Vol.66, pages 1329 to 1334	1-11
A	HUANG J.T. et al., An electrochemical detection scheme for identification of single nucleotide polymorphisms using hairpin-forming probes, Nucleic.Acids.Research, 2002 June, Vol.30, e55	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 14 January, 2004 (14.01.04)	Date of mailing of the international search report 10 February, 2004 (10.02.04)
--	--

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13176

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Keiichiro KANETANI et al., "DNA Shushoku Denkyoku o Riyo shita Denki Kagakuteki Idenshi Kaiseikiho no Kaihatsu (2)", CSJ: The Chemical Society of Japan Koen Yokoshu, 2003, March, Vol.83, page 1113	1-11
P,X	Retsu SAITO, "Post Genome ni Muketa Drug Design -Genomu Kagaku Saizensen-", Nippon Nogei Kagaku Kaishi, 2003, July, Vol.77, pages 647 to 649	1-11
P,X	MAO Y. et al., Studies of temperature-dependent electronic transduction on DNA hairpin loop sensor, Nucleic.Acids., Research, 2003, September, Vol.31, e108., (abstract) Medline [online]; Retrieved from: STN. PubMed Accession no.12954784, STN Accession no.2003415882	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	IMOOS E.C. et al., Characterization of immobilized DNA hairpins containing tethered redox probes, Abstracts Papers Am. Chem. Soc., 2002 Aug., Vol. 224, No. 1-2, INOR 104	<u>1-3</u> 4-11
A	TAKENAKA S. et al., Electrochemistry of ferrocenyl naphthalene diimide derivative and its behavior on hairpin DNA immobilized electrode, Denki Kagaku, 1998, Vol. 66, p. 1329-1334	1-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 01. 2004

国際調査報告の発送日

10. 2. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子

4B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	HUANG J.T.et al., An electrochemical detection scheme for identification of single nucleotide polymorphisms using hairpin-forming probes, Nucleic Acids Research, 2002 June, Vol.30, e55	1-11
P X	金谷啓一郎他, DNA修飾電極を利用した電気化学的遺伝子解析法の開発(2), 日本化学会講演予稿集, 2003 Mar., Vol.83, p.1113	1-11
P X	斉藤烈, ポストゲノムに向けたドラッグデザインーゲノム化学最前線ー, 日本農芸化学会誌, 2003 Jul., Vol.77, p.647-649	1-11
P X	MAO Y.et.al., Studies of temperature-dependent electronic transduction on DNA hairpin loop sensor, Nucleic Acids Research, 2003 Sep, Vol.31 e108. (abstract) Medline [online]; Retrieved from: STN. PubMed Accession no.12954784, STN Accession no.2003415882	1-11

(12) International application published under the Patent Cooperation Treaty

(19) World Intellectual Property Organization

International Bureau

(43) International publication date

2004 April 29 (29.04.2004)

(10) International publication number

WO 2004/035829 A1

(51) International patent classification ⁷: C12Q 1/68

(21) International application number: PCT/JP2003/013176

(22) International filing date: 2003 October 15 (15.10.2003)

(25) Filing language: Japanese

(26) Publication language: Japanese

(30) Priority data:

Patent application 2002-299931

2002 October 15 (15.10.2002) JP

(71) Applicant (for all designated states except US): Mitsui Chemicals, Inc. (JP/JP); 1-5-2 Higashi Shimbashi, Minato-ku, Tokyo 105-7117 (JP).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): SAITO, Isao (JP/JP); 1-21 Kanshuji shibayama, Yamashina-ku, Kyoto City, Kyoto Prefecture 607-8242 (JP). OKAMOTO, Akimitsu (JP/JP); 15-1-404 Katsura-shiba-no-shitacho, Nishikyo-ku, Kyoto City, Kyoto Prefecture 615-8077 (JP). KANATANI, Keiichiro (JP/JP); 14-505 Katagiharamizutsuki-cho, Nishikyo-ku, Kyoto City, Kyoto Prefecture 615-8184 (JP). YOSHIDA, Nobumasa (JP/JP); within Mitsui Chemicals, Include 1144 Togo, Mobara City, Chiba Prefecture 297-0017 (JP). KIJIMA, Shigemoto (JP/JP); within Mitsui Chemicals, Inc. 1-5-2 Higashi-shimbashi, Minato-ku, Tokyo 105-7117 (JP).

(74) Agents: MIYAZAKI, Teruo et al.; No. 16 Kyowa Building 8th Floor, 1-9-20, Akasaka, Minato-ku, Tokyo 107-0052 (JP).

(81) Designated states (National): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated states (Regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB

/There are continuing pages/

GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- With international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) [note: see English given in PCT document]

(57) [note: see English given in PCT document]

Specification

Probes for detecting gene and method of electrochemically detecting gene

Technical Area

The present invention relates to a hairpin type probe that makes possible electrochemical nucleic acid detection, and a chip for detecting a target gene with this fixed, as well as an electrochemical nucleic acid detection method that uses this.

Background Technology

Various methods are used as gene analysis methods based on hybridization. In Southern hybridization and northern hybridization DNA and RNA separated by gel electrophoresis are transferred to a nylon membrane and the like, and hybridization with a labeled probe is carried out. The DNA chip or DNA microarray method makes possible high-throughput gene analysis by fixing DNA groups with the sequences divided on a substrate of glass and the like in a state formed in a line at a high density; and, with this as probe, carries out hybridization with respect to the DNA and RNA that is the target of the investigation. In an analysis by means of these hybridizations, labeling either the probe or the nucleic acid that forms the examination target with a radioactive compound or fluorescent substance is common. In the case of a label based on a radioactive compound, handling within a controlled area is a precondition, and the facilities that can use it are limited. On the one hand, with a label based on a fluorescent substance, handling in an ordinary laboratory is possible; on the other hand, because laser light is used in detection, there is the problem that the detection apparatus is large and expensive.

In a DNA chip or DNA microarray an electrochemical detection method is coming to be used as a detection means in the place of a fluorescent assay. For example, the method disclosed in the specification of Japanese patent 2573443, characterized in that a nucleic acid probe is fixed to an electrode surface and used, and specifically bonded to a two chain nucleic acid, and an electrochemically active two chain recognition

body (insertion agent) is added to a reaction system, and the redox current that originates in the insertion agent bonded to the two chain nucleic acid comprised of the nucleic acid probe, and the target gene is measured. In this method, labeling the nucleic acid molecule that is the target of examination beforehand is not necessary, but, following hybridization, the operation of adding insertion agent to the measurement system, as well as removing an excess of insertion agent becomes necessary. Furthermore, with this kind of method, in the measurement system, the amount of binding of the insertion agent to the nucleic acid molecules cannot be strictly controlled. Furthermore, it can be thought that a high level of control of the measurement system, such as using different insertion agents for each probe on one electrode, is difficult.

Disclosure of Invention

The present invention regards as the problem, in addition to adding the nucleic acid of an examination target to a probe for gene detection use fixed to an electrode, the provision of a method that is simple and has a good S/N ratio that does not require a special procedure (such as the labeling of the examination target nucleic acid, the addition of an insertion agent and the like, and the addition of enzymes). The present invention, further, simultaneously regards as the problem, fixing probes for the detection of multiple types of genes on a single electrode and providing a method that can simultaneously detect these target genes.

In order to resolve the above-mentioned problems, the change to the two stranded structure (opened structure) from the hairpin structure (closed structure), accompanying recognition of the target gene, has actively been made use of in the present invention. That is, a DNA molecule was used that includes a mutually complementary inverse repetitive sequence in the molecule and a target gene recognition sequence sandwiched therein. The relevant DNA molecule, in the state in which the target gene does not exist, forms two chains in a stable molecule due to the complementary inverse repeating sequence, and the molecule as a whole takes the structure in which the hairpin shape is closed. When the target gene exists, said target gene is recognized by means of the recognition sequence located in the loop in the hairpin structure, two chains mutually

form and become an open structure. In this process, the high order structure of the relevant DNA molecule greatly changes from the single molecule of the hairpin state to that of two chains (collapse of hairpin) with the target gene.

Furthermore, a system that causes a redox unit to bind to one end of the relevant DNA molecule and detects the above-mentioned collapsed state of the hairpin using an electrochemical reaction was developed. For example, a redox unit is caused to bind to one end of a probe consisting of single stranded nucleic acid that takes the above-mentioned hairpin structure, an electrode is fixed to the other end, and when this is caused to hybridize with the target gene, the hairpin structure collapses, and the electrochemical system on the relevant electrode changes. This change can be thought to occur due to the fact that because the probe fixed to the electrode takes the hairpin structure in the state in which the target gene does not exist, the redox unit bonded to the end approaches the electrode surface, but when the target gene is recognized and two chains are formed, the hairpin structure opens and the relevant redox unit recedes from the electrode surface. Measuring this change as the change of the electric signal of the electric current and the like can confirm the existence of the target gene.

In this way a method that causes a redox unit to bond to the end of the probe that structurally changes the most at the time of the recognition of a target gene and causes a change of the electrical response originating in a redox unit by causing a change of the distance between the redox unit and the electrode was developed and caused the completion of the present invention.

That is, the present invention is as follows.

- (1) A probe for target gene detection use characterized in being
a probe for target gene detection use that includes a recognition sequence able to recognize a target gene, and having a straight chain molecule consisting of at least one of a nucleic acid and a nucleic acid analog, and a redox unit,
and, individually, consisting of a two stranded stem and a single stranded loop, in which said single stranded loop forms a hairpin structure closed by means of said two stranded stem, and due to the fact that the sequence subject to detection that indicates the existence of the target gene and the above-mentioned recognition sequence form two

strands, said hairpin structure opens, and has the sequence necessary for a two stranded part to be formed with the sequence subject to detection on one part of said probe, and the above-mentioned redox unit, when the above-mentioned hairpin structure has been formed, is bonded to other than the above-mentioned single strand loop or is bonded to one of the two strands that approach.

(2) The probe for target gene detection use described in the above-mentioned paragraph (1) in which a sequence able to form the above-mentioned hairpin structure has two mutually complementary inverse repeating sequences, and a target gene recognition sequence consisting of complementary sequences in the sequences subject to detection provided between these repeating sequences.

(3) The probe for target gene detection use described in the above-mentioned paragraphs (1) or (2) in which at least one part of the above-mentioned single stranded molecule is DNA or RNA.

(4) The probe for gene detection use described in the above-mentioned paragraphs (1) or (2) characterized in that at least one part of the above-mentioned single stranded molecule is a peptide nucleic acid.

(5) The probe for gene detection use described in any of the above-mentioned paragraphs (1) – (4) in which the above-mentioned redox unit is included in either of the following positions a) and b).

a) One strand of either of the two strands that compose the above-mentioned two-stranded stem.

b) One end of the above-mentioned straight chain molecule.

(6) The probe for gene detection use described in any of the above-mentioned paragraphs (1) – (6 [note: 5 probably intended]) in which the redox unit is a quinone compound, a metallocene compound, a flavin compound and a porphyrin compound, a metal or metallic compound.

(7) A chip for target gene detection use characterized in being a chip for target gene detection use having a carrier having an electrode surface, and the probe for target gene detection use described in any of the above-mentioned paragraphs (1) – (6) bonded to said electrode surface,

and, when the above-mentioned hairpin structure has been formed, the end region of the strand to which the above-mentioned redox unit is not bonded, between the two strands that bond or approach at other than the above-mentioned single stranded loop, is bonded to the above-mentioned electrode.

(8) The chip for target gene detection use described in the above-mentioned paragraph (7) in which multiple different probes that can specify respective multiple different target genes have been fixed to the above-mentioned electrode surface for each probe, and redox units with different electrical responses for each of the above-mentioned multiple target genes are bonded to each probe.

(9) A target gene detection method characterized in having,
in a method that detects a target gene using a probe,
a step that forms, on the electrode surface of the chip for target gene detection use described in the above-mentioned paragraph (7), a reaction system in which said probe fixed to said electrode surface can make the above-mentioned hairpin structure, and
a step that causes a reaction, in said reaction system, under conditions that can cause a sample and the above-mentioned probe, when an sequence subject to detection has been included in said sample, to form two strands by means of hybridization with said probe and said sequence subject to detection, in which the hairpin structure of said probe is opened and converted to a single strand, and
a step that imparts electric potential to the electrode of the electrode of the chip that has passed through said reaction, and judges the state of the hybridization with said probe and with said sequence subject to detection based on the electric current value obtained.

(10) The target gene detection method described in the above-mentioned paragraph (9) that uses a probe in which multiple probes that recognize multiple different target genes are fixed to different electrodes for each respective probe.

(11) A method that simultaneously detects multiple target genes characterized in having,
in a method that detects a target gene using a probe,

a step that forms, on the electrode surface of the chip for target gene detection use described in the above-mentioned paragraph (8), a reaction system in which said probe fixed to said electrode surface can make the above-mentioned hairpin structure, and

a step that causes a reaction under conditions that can cause a sample and the above-mentioned probe, when at least one kind of sequence subject to detection with respect to the multiple different target genes in said sample has been included, to form two strands by means of hybridization with said probe and said sequence subject to detection, and convert to a single strand that does not have a two strand part with the hairpin structure of said probe opened, and

a step that imparts electric potential to the electrode of the chip that has passed through said reaction, and judges the state of the hybridization with said probe and with said sequence subject to detection based on the electric current value obtained.

Furthermore, the state of the above-mentioned hybridization, normally, represents whether two strands form and the hairpin structure has collapsed, or whether the hairpin structure is unchanged.

By means of using the probe for gene detection use and the electrochemical gene detection method of the present invention, the target gene can be easily and promptly detected without special handling besides regulating the nucleic acid that becomes the sample. Furthermore, in the present invention, because the high order structure of the probe for target gene detection use itself changes, depending on the existence of the target gene, the S/N ratio of detection increases and highly reliable detection results can be given. Consequently, it is effective in the detection of microscopic genes and the detection of SNP and the like.

Furthermore, by using redox units for which the electrical responsiveness differs, concerning the respective probes for which the target gene differs, it is possible to constitute a DNA chip in which these probes are affixed to single electrodes. If said DNA chip is used, it becomes possible to carry out simultaneous detection of multiple genes simply and at a low cost.

The method of the present invention, except for modifying, with a redox unit, the end of a DNA molecule that can take the hairpin structure, requires no special measures, and is extremely simple. By setting the conditions of hybridization with a probe and with

a target gene, detecting, with high sensitivity, the slight array differences and the like of target genes becomes possible.

Furthermore, since a redox unit can be replaced depending on the type of sequence, by means of immobilizing on one electrode a probe consisting of various sequences with units having different redox potentials connected, multiple target genes can be detected simply.

Brief Explanation of the Drawings

Fig. 1 is a schematic diagram of the typical probe for gene detection use in the present invention.

Fig. 2 is a drawing that shows the typical flow of gene detection in the present invention.

Fig. 3 is a schematic diagram of a DNA chip of the single electrode – multielement detection type which the gene detection probe of the present invention uses. Probe 1 has redox unit 1, and probe 2 has redox unit 2.

Fig. 4 is a synthesis flow diagram of an anthraquinone-modified type uridine nucleotide.

Fig. 5 shows the differential pulse voltammogram (when a sequence that perfectly matches is possessed in the recognition sequence of the target gene of ODN1) when ODN2 (WT) was regarded as the specimen.

Fig. 6 shows the differential pulse voltammogram (when consisting of a sequence that does not match the recognition sequence of the target gene of ODN1) when ODN3 (G178MU) was regarded as the specimen.

Fig. 7 shows the differential pulse voltammogram (when consisting of a sequence that does not match the recognition sequence of the target gene of ODN1) when ODN4 (F508) was regarded as the specimen.

Fig. 8 is a graph that has relativized the amount of electric current in differential pulse voltammetry concerning the three specimens, WT, G178 and F508.

Fig. 9 is a graph that has relativized the peak electric current values in differential pulse voltammetry concerning the three specimens, WT, G178MU and G508.

Fig. 10 is a diagram that shows the manufacturing process of ODN5. DMSO indicates dimethyl sulfoxide and DTT indicates dithiothreitol.

Fig. 11 shows the DVP result when ODN2 (WT) was regarded as the specimen, using probe ODN5.

Fig. 12 shows the DVP result when ODN3 (G178MU) was regarded as the specimen, using probe ODN5.

Fig. 13 shows the DVP result when ODN4 (F508) was regarded as the specimen, using probe ODN5.

Fig. 14 shows the calculated result of the S/N ratio.

Fig. 15 shows the results of the electric current values when 10 cycles are repeated in embodiment 4.

Best Mode for Implementing the Invention

The present invention will be explained in detail below.

In the present invention, “probe for target gene detection use” means a molecule for detecting the existence in a sample of nucleic acid molecules that has a sequence in order to specify a target gene regarded as the detection subject, based on a hybridization reaction. The probe for gene detection use in the present invention includes a redox unit, consists of a straight chain molecule, individually takes a closed hairpin structure consisting of a two stranded stem and a single stranded loop, but has the sequential characteristic so as to become an opened structure by means of forming two strands with said target gene under conditions in which the target gene exists. As structures able to form this kind of hairpin structure, for example, those that respectively include, mutually complementary inverse repeating sequences, as well as sequences able to recognize a target gene between said repeating sequences, intramolecularly, can be mentioned.

In “straight chain molecules”, oligonucleotides and the like nucleic acid (DNA or RNA), and nucleic acid analogs (modified nucleic acid) consisting of chemically modified nucleotide units, and, besides what are called chimeric nucleotide and peptide nucleic acid (PNA) that include DNA and RNA, other artificial straight chain molecules that can behave similarly to a nucleic acid molecule in a hybridization reaction are

included. A straight chain nucleic acid can be synthesized by, for example, a DNA synthesizer, and, when necessary, amplifying the synthesized items by means of a PCR is also acceptable. Molecules similar to straight chain nucleic acid also, can be adjusted by methods well known per se.

“Two stranded stem” means two chains intramolecularly formed, “single stranded loop” means the single stranded part that formed a loop shape pursuant to the formation of a two stranded stem. “Closed structure” means the structure of a hairpin shape composed of a two stranded stem and a single stranded loop, and “opened structure” means the state in which the two stranded stem is dissociated. Furthermore, a “single stranded loop” need not necessarily be a loop shape and can take a random structure but does not contribute to the stabilization of the “closed structure”.

A “complementary inverse repeating sequence” is one able to form two strands stabilized intramolecularly due to forming a Watson-Crick base pair, and that it is a group of arbitrary arrangements with no relation to the target gene is acceptable, that the unit is 3 bases or more is desirable, and a more desirable length is 5 – 8 bases, but in the application of one part, a still longer repeating unit is suitable. Furthermore, it is desirable that said repeating units be placed, respectively, at both ends, or in the vicinity of the ends of the probe molecule for gene detection use.

A “recognition sequence that can recognize a target gene”, or a target gene recognition sequence, means a sequence complementary to the sequence subject to detection (base sequence) that specifies the gene desired to be detected, and the range of the desirable lengths is 7 – 40 bases. In the probe for gene detection use of the present invention the target gene recognition sequence is placed sandwiched between each repeating unit of the complementary inverse repeating sequence. Because of the characteristics of this kind of sequence, the probe for gene detection use of the present invention, when the target gene does not exist or the conditions of hybridization with the target gene are not sufficient, forms a two stranded stem structure formed by means of the complementary inverse repeating sequences hybridizing with each other and a closed molecule structure formed by means of a single stranded loop structure consisting of the target gene recognition sequence.

Consequently, the fact that “those that respectively include, mutually complementary inverse repeating sequences, as well as sequences able to recognize a target gene between said repeating sequences, intramolecularly,” can be said to be a typical example of a “individually takes a closed [note: the first appearance of this passage, above, includes “hairpin” here] structure comprised of a two stranded stem and a single stranded loop, but has the arrangement characteristic so as to become an opened structure by means of forming two strands with said target gene under conditions in which the target gene exists.”

As for a sequence that can recognize a target gene, being positioned in a single stranded loop is desirable, and the case of one part, or all, of one, or both, of the above-mentioned repeating sequence (the part that forms a stem) being included in one part of the sequence that can recognize a target gene is also acceptable.

Furthermore, the sequence subject to detection that specifies a target gene is the sequence that includes the molecule actually used in the hybridization reaction with a probe. It is acceptable if this sequence subject to detection is the target gene itself that is desired to be detected, or a complementary sequence of a part that is characteristic of that target gene that is contained in the target gene. It is acceptable if this kind of partial sequence is a fragment directly obtained from an isolated gene, or one synthesized based on a partial sequence selected from the base sequence of the target gene.

This kind of structure composed from a two stranded stem structure and a single stranded loop, generally, is also called a hairpin structure, but the stability of that structure, in the case of DNA and RNA, is affected by the temperature and salt concentration of the buffer solution in which said probe exists, in addition to the length and kind of the complementary repeating sequence concerned in the intermolecular two stranded formation. For example, in an oligonucleotide molecule consisting of 27 bases, in the case of complementary inverse repeating sequences of five bases that amount to 5' – TTGAG – 3' / 5' – CTCAA – 3', the T_m value involved in the intramolecular two stranded formation is estimated to be approximately 54°C, based on the actual measurement value, in a buffer solution that contains 50 mM of NaCl. The T_m value in the two stranded formation of a probe molecule and target gene is decided by the length and type of the recognition sequence of the target gene; and when said sequence is 20

mer or less, following the rules of Wallace, the T_m value can be approximately given by the following formula. $T_m (^{\circ}\text{C}) = 2 \times (\text{number of A and T}) + 4 \times (\text{number G or C})$. In the case of a sequence larger than 20 mer, several calculation methods, such as the nearest-neighbor method, are appropriate.

When the existence of a target gene is detected by means of the probe for gene detection use of the present invention, it is desirable to set the T_m value in the two stranded formation of the probe molecule and the target gene to be the same as, or higher than, the T_m value in the two stranded formation inside the probe molecule. The desirable length of the recognition sequence of the target gene is from 15 to 18 mer, but, depending on the target, ones shorter and longer than this can also be used.

In the target gene analysis method of the present invention, the hairpin structure is regarded as being maintained by the probe alone; and, when a molecule having the sequence subject to detection and the probe are hybridized, a reaction of the sample with the probe is carried out under conditions in which the hairpin structure is done away with.

Concerning the salt concentration of the buffer solution, when the probe molecule is DNA and RNA, hybridization is affected. Because the two strands are stabilized by the existence of positive ions, generally, in the case of high ion strength, the T_m value becomes higher. On the other hand, when the probe molecule is formed of peptide nucleic acid, the effect of ion strength becomes smaller.

In the probe for gene detection-use of the present invention, when designing the target gene recognition sequence, the base sequence of the target gene itself, or the consensus sequence of the gene family to which the target gene belongs and the like sequence information is necessary. The work of picking out the recognition sequence that has the appropriate T_m value from among the sequence information can even be carried out by visual observation, but it possible to use commercially available primer design programs or online programs offered by public institutions and the like, for example, Oligo Calculator (<http://mbcf.dfci.harvard.edu/docs/oligocalc.html>).

In contrast to this, arbitrarily setting the complementary inverse repeating sequence without relation to the target gene is possible. Generally, that it be a sequence that contributes to the formation of a stable hairpin structure, that it be a sequence that has no complementarity with respect to the target gene recognition sequence, and that it

be a sequence in which the T_m value in the intramolecular two stranded formation gives a value that is the same as the T_m value in the two stranded formation of the target gene, or a value lower than that, is desirable, but, depending on the target, concerning one or both of said repeating sequences, there are cases in which part or all thereof is included in part of the target gene recognition sequence.

Since most of the various kinds of primer design programs can calculate the ease of the intramolecular two stranded formation, they can be used as a standard of sequence determination.

In the probe for target gene detection use of the present invention, the redox unit, in the state in which a two stranded stem forms, is bonded to one strand that forms this two stranded stem. Furthermore, when the two strands that form a two stranded stem have parts lengthened from the two stranded stem on the side opposite the single stranded loop of the two stranded stem, binding the redox unit to one of these lengthened parts is also acceptable. For example, it is desirable that the redox unit be included in either of the following positions a) and b).

a) On either of the stems that form the two stranded stem at the time of formation of the closed structure composed of a two stranded stem and a single stranded loop.

b) A straight chain nucleic acid or either end of a molecule similar thereto.

The probe for gene detection use of the present invention is characterized in that, by itself, a closed structure consisting of a two stranded stem and single stranded loop can be adopted, but, under conditions in which a sequence subject to detection for the purpose of specifying a target gene exists, becomes an opened structure due to the formation of two strands with said sequence subject to detection. Before and after the recognition of this kind of target gene, what changes the most structurally is the region that forms the two stranded stem. In the present invention, the use of this kind of structural change as the change of an electric signal is regarded as characteristic. Consequently, as for the redox unit, in the matter of the probe for gene detection use of the present invention, being included on one of the strands that forms the two stranded stem is desirable, and as this kind of method, being placed on one of the repeating units of the mutually complementary inverse repeating sequences is desirable. In the probe for gene detection use of the present invention, because placing mutually complementary inverse repeating

sequences on both ends of the probe is desirable, that a redox unit is included on either end of a straight chain nucleic acid that forms the probe or a molecule similar thereto is still more desirable. Here, it is not necessary that “end” be strictly the end, a range of 3 – 5 parts at the unit of a nucleotide is allowed. That is, even in the kind of case in which a redox unit has been bonded to the fifth nucleotide from the end of the molecule, it is regarded as included in the “end”. Furthermore, when, depending on the target, a linker molecule and the like is bonded to the end of a straight chain nucleic acid or a molecule similar thereto, including a redox unit in said linker is also acceptable.

As the desirable modes in which a redox unit is included in a probe molecule, the cases of being directly or, via a linker molecule, covalently bonded to a straight chain nucleic acid or a molecule similar thereto (nucleic acid analogs) can be mentioned, but the modes are not limited thereto.

It is desirable that a redox unit bonded to a probe for gene detection use of the present invention be a substance having a redox potential of +1.0 - -1.0 V in independent measurement (measurement in the state in which a probe and the like is not bonded). Still more desirable is that ones selected from organometallic complexes, metals and metallic compounds represented in quinone and derivatives thereof such as quinone compounds, flavin and derivatives thereof such as flavin compounds, porphyrin and derivatives thereof such as porphyrin compounds, ferrocene and the like metallocene compounds can be used. As quinone compounds, anthraquinone and pyrroloquinoline quinone can be mentioned. Bonding multiple redox units to one probe, as necessary, is also acceptable.

The schematic structure thereof and the general chemical formula of a typical probe for gene detection use of the present invention are set forth in Fig. 1. In the chemical formula, N indicates an arbitrary nucleotide, A indicates an adenosine nucleotide, and U indicates a uridine nucleotide. Redox indicates redox unit. 1 in the diagram indicates the main body of the probe molecule, 2 and 8 indicate complementary inverse repeating sequences. And, 3 is a target gene recognition sequence that forms a single stranded loop in the formation of a hairpin structure. In contrast to 10 that is a molecule consisting of an oligonucleotide, 9 indicates a linker consisting of 6-mercaptophexanol. That the redox unit indicated by 4 is covalently bonded to the uracil base of a uridine nucleotide is shown.

In the event the probe molecule (the part that does not contain the redox unit of the probe for gene detection use of the present invention) consists of DNA or RNA, synthesizing it by means of a commercially available DNA/RNA synthesizer is possible. In many cases, even concerning cases consisting of nucleic acid that includes various types of modified nucleotides similar to DNA or RNA nucleotides, synthesizing using a commercially available DNA/RNA synthesizer is possible.

When peptide nucleic acid is included in a probe molecule, synthesizing by means of a liquid phase process and a solid phase process the same, a peptide is possible, and the synthesized item is also commercially available. Concerning the peptide nucleic acid synthesis method, the details are published in the specification of the publication of the Japanese translation of PCT application number Hei 6-509063, the specification of US patent number 2758988, P. E. Nielsen et al., Journal of American Chemical Society, 114, 1895-1987 (1992), P. E. Nielsen et al., Journal of American Chemical Society, 114, 9677-9678 (1992) and the like.

The typical electrochemical gene detection method of the present invention is explained in Fig. 2. The most desirable gene detection mode in the present invention is the one carried out by the mode with the probe for gene detection use of the present invention fixed on an electrode surface, and still more desirable is the one carried out by the mode of a DNA chip with probes for detecting multiple types of genes fixed to electrodes arranged on a carrier or substrate.

In Fig. 2, the probe molecule is bonded to the electrode surface of 5 via the thiol group of 6 positioned at the end of the linker consisting of 6-mercaptohexanol of 9. The hairpin structure opens by recognizing the target gene 7 and two strands consisting of 7 and 1 are formed. Pursuant to this kind of structural change, the distance of the redox unit of 4 from the electrode surface is caused to change, and the change of said distance becomes measured as the change of the electric current value.

The “probe for target gene detection use” of the present invention means that which has fixed the probe for gene detection use of the present invention consisting of a single type or multiple types on the surface of an electrode arranged on the surface of an appropriate carrier, for example, a substrate and base substance of various shapes, and when a probe of multiple types is used, fixing this to a single electrode is acceptable, or

the method that fixes to individual electrodes in a state systematically ordered so that the position information of each probe can be traced can be used.

When multiple different probes are used, since the electrical responsiveness of the redox unit changes for each of the differing multiple probes that recognize the differing target genes, which sequence subject to detection was hybridized to which probe can be detected from the electrical responsiveness that can be obtained, and the target gene can be specified based on the information related to the target gene recognition sequence of the probe hybridized with the sequence subject to detection. For example, to obtain a system that can detect the first and the second of two target genes, a first probe that has a sequence complementary to a nucleic acid molecule that has the first sequence subject to detection that can specify the first target gene, and a second probe that has a sequence complementary to a nucleic acid molecule that has the second sequence subject to detection that can specify the second target gene, and has a redox unit with a different electrical response than that of the first probe, are fixed to a single electrode, or to two respectively independent electrodes, dividing the region, and caused to react with a sample. When a nucleic acid molecule that has the first sequence subject to detection exists in the sample, detection of the first target gene becomes possible by means of the change of the electrical response of the redox unit that has the first probe, and when the nucleic acid molecule that has the second sequence subject to detection exists in the sample, detection of the second target gene becomes possible by means of the change of the electrical response of the redox unit that has the second probe. When nucleic acid molecules that have both of these first and second sequences subject to detection exist in a sample, detection of the first and second target genes becomes possible based on the change of the electrical responses of the redox unit that has the first probe, and the change of the electrical responses of the redox unit that has the second probe that differs therefrom.

In a DNA chip of the present invention, it is desirable that a probe for gene detection use of the present invention be fixed to an electrode surface by means of bonding with either of the following parts c) and d).

c) One strand that does not contain a redox unit among the two strands that form a two stranded stem at the time of formation of a closed structure consisting of a two stranded stem part and a single stranded loop part.

d) The end that does not contain the redox unit of a straight chain nucleic acid or a molecule similar thereto.

The probe for gene detection use of the present invention is characterized in independently taking a closed structure consisting of a two stranded stem part and a single stranded loop part, but, under conditions in which a sequence subject to detection that specifies a target gene exists, becomes an opened structure due to the forming of said target gene and two strands. In the DNA chip of the present invention, there is the characteristic that gene detection is carried out by means of reading the change of distance with respect to the electrode of the redox unit, before and after the recognition of a target gene, as an electric current. Consequently, fixing a probe so that the change of the distance concerned becomes the greatest is desirable; for this purpose, among the two strands that constitute a two stranded stem, fixing one strand that does not contain a redox unit, or an end that does not contain the redox unit of a straight chain nucleic acid that constitutes a probe or a molecule similar thereto, to an electrode is desirable. Here also, it is not necessary that “end” be strictly the end, a range of 3 – 5 parts at the unit of a nucleotide is allowed. Furthermore, when, depending on the target, a linker molecule and the like is caused to bond to the end of a straight chain nucleic acid or a molecule similar thereto, fixing by means of causing said linker and the electrode surface to bond is possible. In the case of the probe shown in Fig. 1, fixing is carried out by causing the SH group of the 6-mercaptohexanol bonded to the 3' end of a nucleotide chain to bond to the electrode surface.

As shown in Fig. 3, the method that fixes multiple types of probes to a single electrode and is used is the method that should be characteristic of the present invention and can be done by using redox units with mutually different electrical responses concerning each of the multiple probes of different target genes.

For example, with respect to probe 1 and probe 2 for which the target genes are different from each other, when redox units consisting of anthraquinone and ferrocene, respectively, are used, in differential pulse voltammetry the peak of the electric

current value in the hairpin state can be seen in the vicinity of -0.5 V with probe 1 and in the vicinity of $+0.3$ V with probe 2. Consequently, even if these probes were fixed to the same electrode, mutually distinguishing and detecting target gene one or target gene two is possible by reading the peak electric current values with respect to the respective probes without individually changing the measurement conditions. As for a DNA chip for this kind of single electrode – multielement analysis use, it can be expected that the structure of the chip can be regarded as simple, and the manufacturing cost of the chip and the cost required in measurement can be made lower.

As the material of the electrodes that can be used in the method for electrochemical gene detection of the present invention, graphite, glassy carbon and the like carbon electrodes, platinum, gold, palladium, rhodium and the like precious metal electrodes, titanium oxide, stannic oxide, manganese oxide, lead oxide and the like oxide electrodes, Si, Ge, ZnO, CdS and the like semiconductor electrodes, titanium and the like electronic conductors can be mentioned, but using gold or glassy carbon is particularly desirable. It is acceptable to cover these electronic conductors by means of electrically conductive polymer and by means of monomolecular film.

As the carrier that mounts the electrode, using hydrophobic or low hydrophilic electric insulating material is desirable, and as this kind of material, glass, cement, ceramics and porcelain and the like ceramics or new ceramics, polyethylene terephthalate, cellulose acetate, polycarbonate of bisphenol A, polystyrene, polymethyl metacrylate and the like polymers, silicon, activated carbon, porous glass, porous ceramics, porous silicon, porous activated carbon, textile fabric, nonwoven fabric, filter paper, short fiber, membrane filter and the like porous substances and the like can be mentioned; but if it is various types of polymer, glass or silicon, it is, particularly, desirable. This is due to the ease of surface treatment and the ease of analysis by means of an electrochemical method. Neither the electrical insulating carrier nor the substrate thickness is, particularly, restricted.

When multiple electrodes are placed on a carrier or substrate, that the respective electrodes do not come into contact with each other, and that they are systematically placed on said carrier or substrate is desirable. It is also acceptable to provide on said carrier or substrate a layer consisting of a hydrophilic polymer material having an electric

charge and a layer consisting of a cross linking agent before providing the electrodes. By providing this kind of layer, the unevenness of said carrier or substrate can be reduced. Furthermore, depending of the type of carrier or substrate, it is also possible to include a hydrophilic polymer material having an electric charge inside that material, and a carrier or substrate that has had this kind of treatment performed can also be desirably used.

As the method of fixing a probe to the electrode surface, various methods can be used, but those done through the aid of a covalent bond are desirable. As this kind of fixing method, the method that modifies the end of the probe with a compound that includes the thiol group, for example, 6-mercaptohexanol, and fixes by means of a thiol bond to the surface of an activated gold electrode can be mentioned. At the time of this kind of bond, causing a spacer molecule of the appropriate size to be disposed between the probe molecule and the activated group of the electrode surface is also acceptable.

Carrying out the fixation of the probe molecule by the spot application on the electrode surface of a water solution in which the probe molecule has been dissolved or dispersed is desirable. It is also acceptable to cause an additive to be contained in the water solution that contains the probe molecule that can heighten the viscosity of that water solution. As this kind of additive, sucrose, polyethylene glycol, glycerol and the like can be mentioned. After the spot application, the probe molecule is fixed when let stand for several hours undisturbed at a prescribed temperature. Spot application can also be carried out by manual operation, but can also be carried out using a spotter provided in DNA chip manufacturing equipment regarded as universal. After spot application, carrying out incubation is also acceptable. After incubation, washing and removing the unfixed probe molecules is desirable.

A DNA chip prepared as mentioned above can be used immediately with respect to nucleic acid that becomes the target of inspection.

In the present invention, the detection of various genes can be carried out by means of changing the target gene recognition sequence in the probe for gene detection use. In the food product area, when probes for gene detection use regarded as complementary sequences to the base sequences of all the microorganisms contained in food products or in one part thereof are used, direct detection of the microorganisms contained in food products can be carried out, and a food product sanitation inspection

becomes possible. As this kind of microorganism contained in food products, for example, pathogenic *Escherichia coli*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Salmonella* can be mentioned.

In the agriculture, forestry and fishery industries area, use is possible in the detection of the pathogenic microorganisms or viruses of crops, farm animals, and fish, and the examination and the like of the producing areas and brands of agricultural products and livestock products. Furthermore, use is possible also in the detection of genetically modified crops and livestock products. When a probe has used a complementary sequence in the base sequence of a plant virus or viroid as the recognition sequence, detection of a plant virus or viroid that has infected a plant can be carried out, and the diagnosis of a contagious condition in the agricultural area becomes possible. As this kind of plant virus or viroid, for example, the tobacco mosaic virus and the cauliflower mosaic virus can be mentioned. When a probe is used that regards a complementary sequence in the base sequence of all, or a part thereof, of the pathogenic microorganisms or viruses that infect farm animals and fish as the recognition sequence, detection of the pathogenic microorganisms or viruses that infect fish can be carried out, and diagnosis of a contagious condition in the livestock area and the fishery area becomes possible. As this kind of pathogenic virus and microorganism, for example, the foot-and-mouth disease virus and pathogenic *Vibrio* can be mentioned.

In the medical treatment area, detection of pathogenic microorganisms or viruses that bring about infection and contagious conditions and the like in the human body, causal genes of hereditary diseases, activated proto-oncogenesis and the like is possible. When a probe that regards a complementary sequence in all, or one part thereof, of the pathogenic microorganisms or viruses that bring about infections and contagious conditions in the human body as the recognition sequence is used as the nucleic acid probe, diagnosis of contagious conditions becomes possible. As this kind of pathogenic microorganism that brings about infection and a contagious condition and the like in the human body, for example, streptococcus, mycoplasma, clostridium, chlamydia, salmonella, herpes simplex, and cytomegalo virus that are pathogenic microorganisms can be mentioned.

When a probe is used that regards a complementary sequence in the base sequence of all or part of the causal gene of a hereditary disease as the recognition

sequence, direct examination of the hereditary disease becomes possible. As this kind of causal gene of a hereditary disease, for example, the causal genes of adenosine deaminase deficiency and sickle cell anemia can be mentioned.

When a probe is used that regards a complementary sequence in the base sequence of all or part of an activated proto-oncogene as the recognition sequence, a cancer diagnosis becomes possible. As this kind of activated proto-oncogene, for example, the cancer genes entered in the Cancer Gene Data Book (Masashi Shibuya, Shujunsha) can be mentioned.

There are times when the causal genes of a hereditary disease, the ease of contracting another disease, and the ease of the effectiveness of medicine and the like, are determined by a single nucleotide polymorphism (SNP) on a gene. In the detection of this kind of gene, distinguishing the slight differences in terms of structure from the standpoint of the different genes for each specimen is necessary, rather than the detection of the existence and the expression of the relevant gene itself. In the present invention, the detection of the existence of SNP in a specimen is possible due to the use of stricter hybridization conditions.

In the gene detection method of the present invention, first of all, the nucleic acid that becomes the subject of investigation is prepared by the operation of extraction from the various materials and biological tissues. When DNA is prepared from biological tissue, various types of DNA kits offered by reagent manufacturers and the like, for example, "Get pureDNA Kit-Blood (manufactured by Dojindo Laboratories) suitable for preparing from blood and ISOHAIR (manufactured by Nippon Gene Co., Ltd.) suitable for preparing from hair and the like can be used. The prepared nucleic acid, when necessary, for example, can be amplified by a polymerase chain reaction (PCR) and the like; and in the case of RNA, converting to the corresponding DNA by means of reverse transcription can be used.

Next, hybridization of the nucleic acid obtained by the above-mentioned operation and the probe for gene detection use of the present invention is carried out using a DNA chip. In the present invention, before hybridization, chemical treatment that labels and the like the nucleic acid is not necessary, but when the nucleic acid sample is two stranded DNA, denaturing by means of a heat treatment and using in hybridization as

single stranded is desirable. Hybridization is implemented by means of causing a sample solution in which nucleic acid is dissolved or dispersed to make contact with the probe for gene detection use of the present invention. Implementing hybridization in the temperature range of 20 – 40°C, and in the time range of 1 – 24 hours is desirable, but setting the optimal conditions of hybridization in response to the chain length of the probe molecule fixed to the electrode and the type of the sample nucleic acid, is advisable. After hybridization ends, carrying out washing and the removal of the unreacted sample nucleic acid fragments is desirable.

With the gene detection method that the DNA chip of the present invention uses, after hybridization of a nucleic acid sample, measurement of the electric current can be carried out immediately, without going through a special operation. As for measurement of the amount of electric current, any method is acceptable, if it can measure the electric current that flows between the electrode and the redox unit. Using cyclic voltammography (CV), differential pulse voltammography (DPV), linear sweep voltammography, and a potentiostat and the like is desirable. Dipping the electrode to which a counter electrode and the probe for gene detection use have been fixed in an electrolyte solution, causing the formation of a system of a pair of electrodes, and measuring the differential pulse voltammography is particularly desirable. [note: the following sentence fragment appears here: “measuring the ...ferential pulse voltammography is particularly desirable.”]

With DPV, the peak electric current with the electric potential peculiar to the probe can be obtained in accordance with the redox potential of the redox unit used in the probe. This peak electric current is the maximum when the probe takes the hairpin structure and becomes the minimum when the probe and the target gene are forming two strands. In the case of a DNA chip that has fixed probes for detecting multiple types of genes to single electrodes and has used redox units with different electrical responses for each target gene, because characteristic electric potentials exist that give peak electric currents for each individual probe, by means of tracing the changes of the peak electric currents in these electric potentials in DPV, detection concerning the respective target genes can be carried out.

Furthermore, as a solvent of a reaction system that maintains the hairpin structure of an unreacted probe in the reaction of the sample and the probe and forms two strands with the target sequence, as well as a solvent in detection based on the change of the electric current of a two strand formation of a probe and a target sequence, using a neutral to weakly basic buffer solution that contains 1 – 100 mM of MgCl_2 is desirable. Using a buffer solution (pH 8.0) consisting of 10 mM Tris hydrochloric acid, 1 mM EDTA, and using an MgCl_2 concentration in a range of 3 – 10 mM is particularly desirable.

Embodiment

[Embodiment 1]

(1) Synthesis of anthraquinone-modified type uridine nucleotide

The synthesis route is shown in Fig. 4.

Acid chloride (compound 2) was obtained from anthraquinone 2-carboxylic acid by means of thionyl chloride processing. After compound 2 and propargyl amine (1, made by Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) were agitated and caused to react for 4 hours at room temperature in (weight ratio 1 to 1) N, N-dimethyl formamide in the presence of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (1 equivalent weight, made by Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) and extracted, and refined by column chromatography, product 3 (21%) was obtained.

After 5-iodo-2'-deoxyuridine (4, made by Sigma Co., Ltd.) and 4, 4' – dimethoxytrityl chloride (made by Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.) (weight ratio 1 to 1) were mixed in pyridine and agitated for 16 hours at room temperature, caused to react, and extracted, and refined by column chromatography, product 5 (65%) was obtained.

Product 3 and 5 (weight ratio 1 to 1), in the presence of (tetrakis triphenyl phosphine) palladium (0.15 equivalent weight, made by Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) and triethylamine (1 equivalent weight, made by Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), were agitated for 12 hours at room temperature in N, N-dimethyl formamide and caused to react, and, after extraction, were refined by column chromatography, and product 6 (74%) was obtained. Furthermore, product 6 and 2-cyano ethyl tetra isopropyl phosphor diamidite [note: Japanese has, phonetically, “dimiadite”, but this is probably a typographical error] (made by Aldrich Co.) (weight ratio 1 to 1), in the presence of

tetrazol (1 equivalent weight, made by Dojin Chemical Co. [note: possibly, Dojin Laboratories]), was agitated and caused to react for 1 hour at room temperature in acetonitrile, and the obtained product 8 was used unchanged in DNA synthesis.

(2) Preparation of oligonucleotide for probe and sample use

Probe ODN1 has nucleotide sequence (TGAGTATCATCTTTGGTGTTCCTCAA) shown in sequence number 1 of the sequence table. An oligonucleotide was synthesized by a DNA synthesizer and the anthraquinone-modified type uridine prepared by (1) was added at end 5'. After the product was refined, 6-mercaptohexanol was added at end 3'.

ODN1: 5'-U^{Aq} TGAGTATCATCTTTGGTGTTCCTCAA-(CH₂)₆-SH-3'

ODN2 – ODN4 consist of the sequences shown in sequence numbers 2 – 4 of the sequence table, and, respectively, were synthesized by a DNA synthesizer.

ODN2: 3'-CCAATAGTAGAAACCACAAA-5" (WT) (sequence number 2)

ODN3: 3'-CCTTTATTCATAATCTGTTGAA-5" (G178MU) (sequence number 3)

ODN4: 3'-CCTATAGTAACCACAAAGGAA-5" (F508) (sequence number 4)

(3) Preparation of a gold electrode modified by a probe

A gold electrode with an area of 2 mm was boiled for 3 hours in a potassium hydroxide solution, and after being washed in pure water, immersed for 3 hours at room temperature in a concentrated nitric acid solution, was further washed in pure water. Onto the surface of a gold electrode processed as above, 1 µL of the 1-µM-ODN1 solution was dropped, covered by a rubber cap, and let stand for 3 hours at room temperature. After that, the electrode was lightly washed with pure water, and 1 mM mercaptohexanol 1 µL was dropped, covered by a rubber cap and let stand for 3 hours at room temperature.

(4) Hybridization

Hybridization was caused by dropping a solution of 5 mM sodium phosphate, 50 mM sodium chloride, pH 7.0 containing, respectively, 50 nanomol of ODN2 – 4, onto a gold electrode that has immobilized ODN1 and letting stand for 1 hour at room temperature. After that, light washing with a buffer solution was carried out.

(5) Measurement of electric current

Measurement by means of differential pulse voltammetry (DPV) was carried out by electrochemical analyzer model 660A made by ALS, Inc. A saturated calomel

electrode [note: The Japanese text has “karomea” rather than “karomeru” for “calomel”, but this is probably a mistake in the Japanese text.] (SCE) was used for the reference electrode, and a platinum electrode was used for the counter electrode. Measurement was carried out at room temperature in a solution of 5 mM sodium phosphate, 50 mM sodium chloride, pH 7.0, and the pulse period was 200 ms, the scan rate was 100 mV/s, the pulse amplitude was 50 mV, and the pulse width was 50 ms. The respective sample oligonucleotides were measured two times each and the values were averaged.

The DPV result, when ODN2 that contained a sequence that perfectly matched the recognition sequence in probe ODN1 was used as the sample, is shown in Fig. 5. It can be seen that the peak electric current value that could be seen in the state (hairpin) in which the sample was not added, markedly decreases in the state in which the sample has been added (WT).

On the other hand, the DPV results in the cases of ODN3 and ODN4 consisting of sequences that do not match the recognition sequence in probe ODN1 are shown in Fig. 6 and 7. In either case, an electric current response can be seen in both the state in which the sample has not been added (hairpin) and the state in which a sample has been added (G178MU or F508), but in the state in which the sample has been added, both the electric current amount and peak value decrease. This can be thought to suggest that the hairpin structure of the probe is somewhat affected by the addition of the sample, but the change of the electric current value can be thought to be restrained by the adjustment of the conditions of hybridization.

In Fig. 8 and 9, for each sample, the change of the electric current amount and the peak electric current, before and after the time of adding, are relatively set forth. As can be seen from these figures, when the recognition sequence in the probe is perfectly matched, a marked change of electric current response can be observed before and after the time of that recognition. In the case of a sample consisting of a sequence that does not match, that there would be practically no change of the electric current value before and after the time of that recognition is desirable, but the difference in electric current values can be thought to have occurred because the interaction between the probe and the sample could not be eliminated in the hybridization conditions in this embodiment.

However, if there is the difference in electric current value shown in the figures, there is no impediment to detection.

(Embodiment 2)

(1) Preparation of a flavin analog modified type probe

ODN5 that contains a flavin analog as a redox unit was synthesized.

ODN5: 5'-^{fl}TAGCGAAATAAGTATTAGACAACCGCTA-(CH)₆-SH-3'

The flavin analog was synthesized by a method set forth in Ikeda et al., Tetrahedron Letters 42, 2529 (2001).

By means of an automatic DNA synthesizer, an oligo DNA having the sequence (TAGCGAAATAAGTATTAGACAACCGCTA) of sequence number 5 was synthesized by a method that introduced Thiol modifier C6 S-S (made by Glen Research) to the second from end 3' (support nucleoside), and introduced Amino modifier C2 dT (made by Glen Research) to end 5'. After the first approach from support, and deprotection, agitated for 12 hours in a 50 mM sodium phosphate buffer solution (pH 8.7) that contains a flavin analog activated by 20 mM of N-hydroxy-succinimide. Since the reaction liquid was refined by HPLC, an oligo DNA with a flavin analog added to the 5' end was obtained. Furthermore, this was agitated for 30 minutes in a DTT solution (50 mM Na phosphate, pH 8.4) of 0.1M and reduction of the S-S bond was carried out, and by HPLC refining, a 3' end hexanethiol-modified oligo DNA (ODN5) was obtained (Fig. 10).

(2) Preparation of a gold electrode modified by a probe, carried out by the method stated in hybridization Embodiment 1.

(3) Measurement of the electric current value by means of DVP carried out by the method stated in Embodiment 1.

The DPV results when ODN3 (G178MU), complementary to a recognition sequence in probe ODN5, was used as a sample are shown in Fig. 12. It can be seen that the peak electric current value that could be observed in the state (hairpin) in which the sample was not added is markedly reduced in the state (G178MU) in which the sample was added.

On the other hand, the DPV results when ODN2 (WT) and ODN4 (F508) that are not complementary to the recognition sequence in probe ODN5 were regarded as the samples are shown in Fig. 11 and 13, respectively. In either case, the electric current

response, practically, does not change in the state (hairpin) in which a sample has not been added and in the state (WT or F508) in which a sample has been added.

(Embodiment 3)

The S/N ratios in gene detection were calculated and compared concerning the anthraquinone-modified type probe used in Embodiment 1 and the flavin-modified type probe used in Embodiment 2. Here the S/N ratio is defined as the value of the electric current amount ($A_{p_{after}}$) after hybridization subtracted from the electric current amount ($A_{p_{before}}$) before hybridization divided by the electric current amount ($A_{p_{before}}$) before hybridization. The calculation results are shown in Table 1 and Fig. 14.

Table 1. S/N ratio of a gene detection experiment using anthraquinone-modified type and flavin-modified type probes (Average value of the results measured three times)

Probe	Redox unit	Sample	S/N = $(A_{p_{before}} - A_{p_{after}})/A_{p_{before}}$
ODN1	Anthraquinone	ODN2 (WT)	0.608
ODN1	Anthraquinone	ODN3 (G178MU)	0.121
ODN1	Anthraquinone	ODN4 (F508)	0.243
ODN5	Flavin	ODN2 (WT)	0.032
ODN5	Flavin	ODN3 (G178MU)	0.575
ODN5	Flavin	ODN4 (F508)	0.010

Because the sequences of the probes differ, they cannot be unconditionally compared, but as for the case of a flavin-modified type probe compared to an anthraquinone-modified type probe, the results were ideal with the S/N ratio high with respect to a complementary sequence, and the S/N ratio low with respect to a sequence that is not complementary.

(Embodiment 4)

Change of the electric current value when a DNA-modified electrode was repeatedly used

Hybridization/denaturation using an ODN5-modified electrode prepared by Embodiment 2 was repeatedly carried out, and the change of the electric current value was investigated. ODN3 (G178MU) that is a complementary target, or ODN2 (WT) and ODN4 (F508), were added to an ODN5-modified electrode and hybridization was carried out, and the electric current value was measured by means of DPV. Continuing, the electrode was immersed for 1 minute in a 90% formamide/10% TE buffer solution and the 2 chain state was caused to dissociate, and after 1 minute in the TE buffer, the electric current value was measured by means of DPV. The results of the electric current value when the above-mentioned operation was regarded as one cycle and ten cycles were repeated are set forth in Fig. 15. When ODN3 (G178MU) that is a complementary target was used, an electric current value that reflected the hairpin state and the two strand state about the time of hybridization was shown, and even when the cycles were repeated, their values were, practically, uniform. On the other hand, when ODN2 (WT) or ODN4 (F508) that are not complementary to the probe were used, although a little lowering of the electric current value was seen in the latter half of the cycle, a cyclical change of the electric current value that reflected hybridization/denaturation could not be seen. From the above kinds of results, that the detection of genes can be repeated with good reproducibility by using an electrode to which the probe for gene detection use of the present invention has been fixed was shown.

Possibility of Use in Industry

By means of using a hairpin type probe having the redox unit concerned in the present invention as well as the electrochemical gene detection method used therein,

- 1) the detection of target base sequences and single nucleotide polymorphisms,
- 2) a chip for an electrochemical type of target gene detection,
- 3) biosensors

and the like can be provided.

Claims

1. A probe for target gene detection use characterized in being
a probe for target gene detection use that includes a recognition sequence able to recognize a target gene, and having a straight chain molecule consisting of at least one of a nucleic acid and a nucleic acid analog, and a redox unit,

and, individually, consisting of a two stranded stem and a single stranded loop, in which said single stranded loop forms a hairpin structure closed by means of said two stranded stem, and due to the fact that the sequence subject to detection that indicates the existence of the target gene and the above-mentioned recognition sequence form two strands, said hairpin structure opens and has the sequence necessary for a two stranded part to be formed with the sequence subject to detection on one part of said probe, and the above-mentioned redox unit, when the above-mentioned hairpin structure has been formed, is bonded to other than the above-mentioned single strand loop or is bonded to one of the two strands that approach.

2. The probe for target gene detection use described in Claim 1 in which a sequence able to form the above-mentioned hairpin structure has two mutually complementary inverse repeating sequences and a target gene recognition sequence consisting of complementary sequences in the sequences subject to detection provided between these repeating sequences.

3. The probe for target gene detection use described in Claims 1 or 2 in which at least one part of the above-mentioned single stranded molecule is DNA or RNA.

4. The probe for gene detection use described in Claims 1 or 2 characterized in that at least one part of the above-mentioned single stranded molecule is a peptide nucleic acid.

5. The probe for gene detection use described in any of Claims 1 – 4 in which the above-mentioned redox unit is included in either of the following positions a) and b):

a) One strand of either of the two strands that compose the above-mentioned two strand stem.

b) One end of the above-mentioned straight chain molecule.

6. The probe for gene detection use described in any of Claims 1 – 5 in which the redox unit is a quinone compound, a metallocene compound, a flavin compound and a porphyrin compound, a metal or metallic compound.

7. A chip for target gene detection use characterized in being
a chip for target gene detection use having a carrier having an electrode surface,
and the probe for target gene detection use described in any of Claims 1 – 6 bonded to
said electrode surface,

and, when the above-mentioned hairpin structure has been formed, the end region
of the strand to which the above-mentioned redox unit is not bonded, among the two
strands that bond or approach at other than the above-mentioned single stranded loop, is
bonded to the above-mentioned electrode.

8. The chip for target gene detection use described in Claim 7 in which multiple
different probes that can specify respective multiple different target genes have been
fixed to the above-mentioned electrode surface for each probe, and redox units with
different electrical responses for each of the above-mentioned multiple target genes are
bonded to each probe.

9. A target gene detection method characterized in having,
in a method that detects a target gene using a probe,
a step that forms, on the electrode surface of the chip for target gene detection use
described in Claim 7, a reaction system in which said probe fixed to said electrode
surface can make the above-mentioned hairpin structure, and

a step that causes a reaction, in said reaction system, under conditions that can
cause a sample and the above-mentioned probe, when an sequence subject to detection
has been included in said sample, to form two strands by means of hybridization with
said probe and said sequence subject to detection, in which the hairpin structure of said
probe is opened and converted to a single strand, and

a step that imparts electric potential to the electrode of the electrode of the chip
that has passed through said reaction, and judges the state of the hybridization with said
probe and with said sequence subject to detection based on the electric current value
obtained.

10. The target gene detection method described in Claim 9 that uses a probe in
which multiple probes that recognize multiple different target genes are fixed to different
electrodes for each respective probe.

11. A method that simultaneously detects multiple target genes characterized in having,

- in a method that detects a target gene using a probe,
- a step that forms, on the electrode surface of the chip for target gene detection use described in Claim 8, a reaction system in which said probe fixed to said electrode surface can make the above-mentioned hairpin structure, and
- a step that causes a reaction under conditions that can cause a sample and the above-mentioned probe, when at least one kind of sequence subject to detection with respect to the multiple different target genes in said sample has been included, to form two strands by means of hybridization with said probe and said sequence subject to detection, and convert to a single strand that does not have a two strand part with the hairpin structure of said probe opened, and
- a step that imparts electric potential to the electrode of the chip that has passed through said reaction, and judges the state of the hybridization with said probe and with said sequence subject to detection based on the electric current value obtained.

[note: The International Search Report is already translated.]